

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

BRUNA DA SILVA SOLEY

**ENVOLVIMENTO DAS CININAS NO PROCESSO
DE CICATRIZAÇÃO DA PELE**

Curitiba
2015

BRUNA DA SILVA SOLEY

ENVOLVIMENTO DAS CININAS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE

Dissertação de mestrado desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), apresentada ao departamento como requisito parcial para a obtenção do título de Mestrado.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini

Co-orientador: Prof. Dr Michel Fleith Otuki

Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia da Pele (LaFFPeI)

Curitiba

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Soley, Bruna da Silva

Envolvimento das cininas no processo de cicatrização da pele./ Bruna da Silva Soley. – Curitiba, 2015.

69 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Daniela de Almeida Cabrini

Co-orientador: Michel Feith Otuki

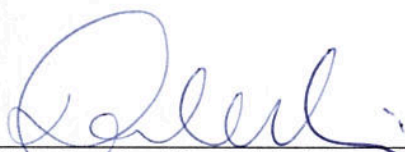
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Pele 2. Cininas 3. Cicatrização I. Título II. Cabrini, Daniela de Almeida III. Otuki, Michel Feith IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.778

PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DAS CININAS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE", de autoria da pós-graduanda BRUNA DA SILVA SOLEY, sob orientação do Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini e composta por: Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia – UFPR) e Prof.^a Dr.^a Olga Meiri Chaim (Biologia Celular – UFPR), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi Aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora. Em Curitiba, 12 de março de 2015.



Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia – UFPR)



Prof.^a Dr.^a Olga Meiri Chaim (Biologia Celular – UFPR)

À quem devo tudo.... Minha mãe, Vera Lúcia.
Agradeço por estar sempre ao meu lado, pelos
sacrifícios, incentivo, compreensão e amor.
Obrigada por sempre acreditar em mim, te amo
muito. Você é a razão de tudo....

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr^a. Daniela Cabrini e Prof. Dr. Michel Otuki, por todo ensinamento, auxílio, compreensão, paciência por sempre contribuírem de maneira direta na minha formação acadêmica e pessoal, pelas diversas oportunidades e por acreditarem no meu trabalho ao longo desses anos.

Aos meus queridos amigos e sempre “Co-orientadores”, Daniel Mendes e Cíntia Delai, por toda paciência, todo ensinamento, amizade, broncas, e por estarem ao lado em todos os momentos.... obrigada por tudo!!!

Aos amigos de laboratório, Arthur Prudente, Bruno Deveau, Cíntia Delai, Camila Guimarães, Daniel Mendes, Priscila Pauloski, Graziela Sponchiato, Luise Blind e Verlaine Maturana, muito obrigada por todo o apoio, pelos ensinamentos e pela possibilidade de compartilhar com vocês, diariamente, diversos momentos especiais ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. João Bosco Pesquero por disponibilizar os animais nocaute utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos.

Aos servidores do Departamento e todos os colegas de pós-graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

“Você sempre pode mudar. Transforme-se em
uma versão melhor de si mesmo.”

Madonna

“De nada serve ao homem queixar-se dos
tempos em que vive. A única coisa boa que
pode fazer é tentar melhorá-los.”

Thomas Carlyle

RESUMO

Com o objetivo de verificar o envolvimento do sistema das cininas no processo de cicatrização cutânea, animais nocaute para os receptores cininérgicos (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e *wildtype* (WT/controle) foram submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. Observou-se que no décimo dia após a excisão, os animais WT apresentaram oclusão da ferida igual a $96,13 \pm 0,55\%$, enquanto os grupos nocaute KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂ apresentaram contração da lesão de $91,39 \pm 0,93\%$, $86,80 \pm 1,93\%$ e $82,0 \pm 1,73\%$, respectivamente. Uma vez que foram observadas diferenças com relação ao tempo de resolução do processo de reparo tecidual, foi realizada a avaliação do período de oclusão total das feridas nestes grupos. Os animais WT apresentaram fechamento completo de suas lesões no 12º dia após a realização da excisão, já os animais nocautes tiveram suas lesões elucidadas no 17º (KOB₁), 21º (KOB₂) e 23º dia (KOB₁B₂). Análises realizadas com amostras coletadas durante as diferentes fases do processo de cicatrização (fase inflamatória - 2º, 3º dias, fase proliferativa - 7º dia, e fase de remodelamento tecidual - 10º dia), reforçaram a ocorrência de diferenças no processo de reparação tecidual nos grupos nocaute. Os resultados mostraram que houve redução significativa do número de células infiltradas no tecido lesionado durante a fase inflamatória nos grupos nocaute, sendo esta redução de $30,65 \pm 3,66\%$ (KOB₁), $48,20 \pm 2,52\%$ (KOB₂) e $47,72 \pm 2,29\%$ (KOB₁B₂), no 2º dia após a excisão. Esta redução permaneceu no 3º dia, sendo iguais a $44,26 \pm 7,79\%$ (KOB₁), $67,19 \pm 2,88\%$ (KOB₂) e $60,03 \pm 4,28\%$ (KOB₁B₂), quando comparados ao grupo WT. Na fase proliferativa (7º dia), observaram-se reduções significativas na taxa de reepitelização nos grupos nocautes para o receptor B₂, em comparação ao grupo WT ($76,16 \pm 8,03\%$), sendo estas reduções iguais a $24,94 \pm 8,45\%$ (KOB₂) e $23,63 \pm 5,41\%$ (KOB₁B₂). Análises de amostras referentes à fase de remodelamento tecidual (10º dia) mostraram diferenças nos níveis de colágeno tecidual nos animais nocautes para os receptores das cininas, sendo estas reduções iguais a $18,13 \pm 2,7\%$ (KOB₁), $12,11 \pm 1,52\%$ (KOB₂) e $16,96 \pm 0,51\%$ (KOB₁B₂), em comparação com o grupo controle ($88,9 \pm 2,62 \mu\text{g/tecido}$). Através de análises imunohistoquímicas, foram constatadas reduções significativas na taxa de proliferação de fibroblastos nos grupos nocautes B₂, com reduções de $39,01 \pm 5,96\%$ (KOB₂) e $38,03 \pm 4,32\%$ (KOB₁B₂). Assim como, foram observadas reduções no número de miofibroblastos nestes grupos, sendo estas reduções iguais a $34,87 \pm 3,31\%$ (KOB₂) e $44,10 \pm 3,54\%$ (KOB₁B₂), em comparado ao grupo controle ($32,5 \pm 4,92$ células/campo). No entanto, os dados dos animais KOB₁ foram semelhantes aos dos WT. Os resultados obtidos sugerem a participação do sistema das cininas em processos que compõem a reparação tecidual, auxiliando na compreensão desse processo fisiopatológico e tornando as cininas uma nova opção terapêutica. Observou-se a participação direta do receptor B₂ em processos de proliferação e diferenciação de células que compõem a pele.

Palavras-chave: Cininas, Cicatrização, Pele, receptores cininérgicos, Receptor B₁, Receptor B₂.

ABSTRACT

To verify the involvement of kinins in the skin healing process, knockout animals for kinin receptors (KOB₁, KOB₂ and KOB₁B₂), and wildtype (WT / control) were subjected to excision wound healing model. It was observed that on the tenth day after excision, WT animals had occlusion of the wound equal to $96.13 \pm 0.55\%$, while knockout groups KOB₁, KOB₂ and KOB₁B₂ presented wound closure of $91.39 \pm 0.93\%$, $86.80 \pm 1.93\%$ and $82.0 \pm 1.73\%$, respectively. Since differences with time resolution of tissue repair process were observed, the evaluation of the period of total occlusion of wounds in these groups was performed. Thus, the WT animals showed a complete closure of injuries on the 12th day after excision, and the knockout animals had their injuries elucidated on the 17th (KOB₁), 21th (KOB₂) and 23th day (KOB₁B₂). Analyzes performed on samples collected during the different phases of wound healing (inflammatory phase - days 2 and 3, proliferative phase – day 7, and tissue remodeling phase - day 10), reinforced the occurrence of differences in the repair process tissue in the knockout groups. Results in the knockout groups also show reduction of infiltrated cells in the tissue during the inflammatory phase, with a decline of $30.65 \pm 3.66\%$ (KOB₁), $48.20\% \pm 2.52$ (KOB₂) and $47.72 \pm 2.29\%$ (KOB₁B₂), on the day 2 after excision. This reduction remained on day 3 being equal to $44.26 \pm 7.79\%$ (KOB₁), $67.19 \pm 2.88\%$ (KOB₂) and $60.03 \pm 4.28\%$ (KOB₁B₂), both compared to WT group. In the proliferative phase (day 7), there was a significant reduction in re-epithelialization rate in knockouts groups for the B₂ receptor in comparison to WT ($76.16 \pm 8.03\%$), presenting rate reductions of $24.94 \pm 8.45\%$ (KOB₂) and $23.63 \pm 5.41\%$ (KOB₁B₂). Analysis of samples relating to the phase of tissue remodeling (day 10) showed differences in the levels of collagen tissue, with reduced levels in knockout animals of $18.13 \pm 2.7\%$ (KOB₁), $12.11 \pm 1.52\%$ (KOB₂) and $16.96 \pm 0.51\%$ (KOB₁B₂), compared with the control group (88.9 ± 2.62 g /tissue). In knockouts B₂ groups, immunohistochemical analyzes show significant reductions in fibroblast proliferation rate of $39.01 \pm 5.96\%$ (KOB₂) and $38.03 \pm 4.32\%$ (KOB₁B₂). Again, decreases were observed in the number of myofibroblasts in these groups, equal to $34.87 \pm 3.31\%$ (KOB₂) and $44.10 \pm 3.54\%$ (KOB₁B₂), in comparison with the control group (32.5 ± 4.92 cells/field). Data from KOB₁ animals did not show differences concerning fibroblast proliferation and myofibroblasts. The results suggest the involvement of the kinin system in processes that make up the tissue repair, assisting in the understanding of pathophysiological process, and making kinins a new therapeutic option. Highlighting the B₂ receptor direct participation in proliferation and differentiation of fibroblasts in the skin.

Keywords: Kinins, Wound Healing, Skin, kinin B₁ receptors, kinin B₂ receptors.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01** - Representação da via de formação das cininas BK e LBK e seus metabólitos ativos, des-Arg⁹-BK e des-Arg⁹-LBK, assim como, mecanismos referentes à ativação dos receptores cininérgicos (B₁ e B₂) e suas principais vias de transdução após a ligação com seus respectivos agonistas. 16
- FIGURA 02** - Representação das diferentes fases que compõem o processo de cicatrização cutâneo , assim como, os principais eventos celulares que caracterizam cada uma destas fases.....25
- FIGURA 03** - Análise da taxa de cicatrização cutânea em animais nocaute (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea34
- FIGURA 04** - Fotos representativas do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea35
- FIGURA 05** - Avaliação do período de resolução da lesão de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea37
- FIGURA 06** - Fotos representativas do infiltrado celular presente durante a fase inflamatória (2º e 3º dia) do processo de reparação tecidual em animais nocautes para os receptores de cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea39
- FIGURA 07** - Quantificação do infiltrado celular presente durante a fase inflamatória do processo de cicatrização em animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea..40
- FIGURA 08** - Avaliação da taxa de reepitelização em animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea.41

| | |
|---|----|
| FIGURA 09 - Fotos representativas da histologia de amostras teciduais coletadas durante a fase de remodelamento do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) e animais <i>wild type</i> (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea..... | 43 |
| FIGURA 10 - Quantificação dos níveis de hidroxiprolina em amostras teciduais de animais nocaute (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) e <i>wild type</i> (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea | 45 |
| FIGURA 11 - Fotos representativas de amostras de tecido da ferida de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) e animais <i>wild type</i> (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea imunomarcadas para PCNA..... | 47 |
| FIGURA 12 - Quantificação do número de células imunomarcadas para a proteína PCNA em amostras teciduais coletadas durante a fase de remodelamento tecidual do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) e animais <i>wild type</i> (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. | 48 |
| FIGURA 13 - Fotos representativas do tecido da ferida de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) e animais <i>wild type</i> (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea com imunomarcação para a α -SMA. | 49 |
| FIGURA 14 - Quantificação do número de células imunomarcadas para α -SMA em amostras teciduais coletadas durante a fase de remodelamento tecidual do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB ₁ , KOB ₂ e KOB ₁ B ₂) e animais <i>wild type</i> (WT) submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea..... | 50 |
| FIGURA 15 - Esquema demonstrando o envolvimento dos receptores das cininas em diferentes processos na cicatrização cutânea | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs- Antiinflamatórios não esteroídes;
ALFAC - Solução de álcool, formaldeído e ácido acético glacial;
ANOVA – Análise de variância;
BK – Bradicinina;
BSA – Soro Fetal Bovino (“”, em inglês);
DAB - Diaminobenzidina;
DAG – Diacilglicerol;
Des-Arg⁹-Leu⁸-BK – Antagonista do receptor B1
ECA - Enzima conversora de angiotensina;
E.P.M – Erro padrão da média;
GPCRs – Receptores acoplados à proteína G (“*G protein–coupled receptors*”, em inglês);
HMWK - Cininogênio de alto peso molecular;
HOE140 – Antagonista específico do receptor B2
IFN- δ – Interferon Gama;
IL- Interleucina;
IP₃ – Inositoltrifosfato;
KO – Nocaute;
LBK – Lisil- Bradicinina;
LMWK - Cininogênio de baixo peso molecular
MMP9 - Metaloproteinase 9;
M1/ M2 – Possíveis fenótipos de macrófagos, M1 ou M2 (clássico x alternativo);
NO - Óxido Nítrico;
PBS – Tampão Fosfato de Sódio
PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas;
PGE₂ – Prostaglandina E₂;
ROS – Espécies reativas de oxigênio;
TGF- β - Fator de Crescimento Transformante Beta;
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa;
WT – *wild type* (WT);
 α -SMA - actina de musculatura lisa do tipo alfa (“*Alpha-smooth muscle actin*”, em inglês);

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1. Sistema Calicreína – Cininas | 13 |
| 1.2. Processo de Cicatrização Cutâneo | 17 |
| 1.2.1. Fase Inflamatória | 19 |
| 1.2.2. Fase Proliferativa | 22 |
| 1.2.3. Fase de Remodelamento Tecidual | 24 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 26 |
| 3. OBJETIVOS | 28 |
| 3.1. Objetivos Gerais | 28 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 28 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Animais Experimentais | 29 |
| 4.2. Avaliação do Processo de Cicatrização pelo Método de Excisão | 29 |
| 4.3. Avaliação da Concentração Tecidual de Hidroxiprolina | 30 |
| 4.4. Análise Histológica | 31 |
| 4.5. Análise Imunohistoquímica | 31 |
| 4.6. Análise Estatística | 32 |
| 5. RESULTADOS | 33 |
| 5.1. Avaliação da taxa de cicatrização | 33 |
| 5.2. Influência do sistema das cininas sobre o infiltrado celular | 38 |
| 5.3. Avaliação da taxa de reepitelização | 40 |
| 5.4. Determinação dos níveis teciduais de colágeno | 43 |
| 5.5. Avaliação da taxa de proliferação celular | 46 |
| 5.6. Quantificação do número de miofibroblastos | 48 |

| | |
|----------------------------|-----------|
| 6. DISCUSSÃO | 51 |
| 7. CONCLUSÕES | 61 |
| REFERÊNCIAS | 62 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Calicreína – Cininas.

O sistema calicreína-cininas é um importante mediador de diversos processos fisiológicos e patológicos. Dentre algumas das atividades biológicas atribuídas a este sistema está a modulação da pressão arterial, vasodilatação, extravasamento plasmático, contração da musculatura lisa e sensibilização de fibras nociceptivas (MARGOLIUS, 1998; PHYSIOL et al., 2003). Além disso, em estados inflamatórios, como na asma, alergia e após a ocorrência de lesões, as cininas promovem a migração de células inflamatórias do sangue para os tecidos e ativam vários componentes teciduais como, por exemplo, mastócitos, fibroblastos e ativam fibras sensoriais (SCHREMMER-DANNINGER et al., 1999; CAMPBELL, 2003; COSTA-NETO et al., 2008).

Nesse sistema as cininas são formadas a partir da atividade enzimática de proteases denominadas calicreínas, sobre moléculas precursoras, o cininogênio. Sendo que, a partir de um único gene são codificadas moléculas de cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e cininogênio de baixo peso molecular (LMWK), ambos resultantes de “*splicing*” alternativo durante a transcrição do RNA mensageiro (RNAm) (CAMPBELL, 2003). As calicreínas plasmáticas, formadas no fígado, são responsáveis por clivar o HMWK em bradicinina (BK), a principal representante da família das cininas. Calicreínas teciduais, as quais são expressas em uma variedade de células, clivam o LMWK tecidual, levando a formação da calidina (LBK). Ambas, BK e LBK podem ainda ser clivadas por carboxipeptidases em metabólitos com atividades biológicas específicas, a des-Arg⁹-BK e a des-Arg⁹-LBK (MARGOLIUS, 1998; REGOLI et al., 1998).

Existem ainda, vias alternativas para a formação das cininas que não dependem exclusivamente da atividade dessas proteases, principalmente em tecidos onde não há a expressão de calicreínas teciduais. Nesses casos, as elastases, oriundas de neutrófilos, possuem um papel fundamental, onde clivam o LMWK, tornando-o susceptível a atividade de calicreínas plasmáticas e possibilitando a formação de BK (CAMPBELL, 2003).

A síntese, assim como, os níveis das cininas são controlados, em parte, por inibidores endógenos das calicreínas. Dentre os principais inibidores das calicreínas está a α 2-macroglobulina e a antitrombina III, ambas proteínas plasmáticas que se ligam a porção carboxila da enzima, culminando na inibição da atividade catalítica destas proteases (CAMPBELL, 2003).

Após sua liberação, os efeitos biológicos exercidos pelas cininas duram poucos segundos, devido à sua rápida metabolização por um grupo de peptidases chamadas genericamente de “cininases” (STEWART, 2004; COSTA-NETO et al., 2008; KAKOKI e SMITHIES, 2009). A principal via de metabolização das cininas decorre da ação de cininases do tipo II, ou enzima conversora de angiotensina (ECA), pela remoção de peptídeos da porção C-terminal da molécula, tornando-as inativas (BLAIS et al., 2000). Além disso, tanto a BK quanto a LBK podem ser metabolizadas por outras enzimas denominadas cininases do tipo I ou carboxipeptidases, que retiram resíduos de arginina da posição nove destes peptídeos, originando os metabólitos ativos des-Arg⁹-BK e a des-Arg⁹-LBK, como descrito anteriormente. Estes metabólitos possuem um tempo de meia-vida maior, se comparado com o das cininas, contudo, também sofrem rápida inativação através da atividade enzimática de cininases do tipo II (REGOLI e BARABE, 1980).

A maioria das atividades biológicas atribuídas ao sistema das cininas é gerada a partir da ativação de receptores cininérgicos específicos, B₁ e B₂. Ambos são receptores com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G (GPCRs - “*G protein-coupled receptors*”, em inglês), entretanto apresentam algumas diferenças entre si, como quanto a seus agonistas. O receptor B₂ é preferencialmente ativado pelas cininas ditas “intactas”, BK e LBK, enquanto que o receptor B₁ tem como principais agonistas os metabólitos ativos das cininas, des-Arg⁹-BK e a des-Arg⁹-LBK (HALL, 1997; CAYLA et al., 2002; MARCEAU e REGOLI, 2004).

Outra diferença é que o receptor B₂ é expresso constitutivamente em muitos tecidos, já o B₁ em condições normais está presente em poucos tecidos e em quantidades pequenas, contudo sua expressão é rapidamente induzida frente a situações de estresse ou lesão tecidual. Além disso, o receptor B₂, assim como a maioria dos receptores metabotrópicos, após ser ativado sofre internalização e dessensibilização, o que não ocorre com o receptor B₁.

(REGOLIT e BARABEF, 1980; MARCEAU e REGOLI, 2004; BERTRAM et al., 2007).

Uma vez ativados pelas cininas os receptores cininérgicos (Gq e/ou Gs) podem iniciar a transdução de várias vias de sinalização, sendo a principal delas desencadeada através da estimulação da enzima fosfolipase A₂, levando à liberação de ácido araquidônico e gerando mediadores inflamatórios como a prostaglandina E₂ (PGE₂). Outra possibilidade, é a estimulação da atividade enzimática da fosfolipase C, levando a formação dos segundos mensageiros inositoltrifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), os quais induzem a mobilização do cálcio intracelular e a ativação da proteína quinase C. Sendo, principalmente, a partir dessas vias que as cininas são capazes de ativar as células e desencadear os diversos efeitos celulares descritos anteriormente (Figura 1) (HALL, 1997; MARCEAU e REGOLI, 2004; PIETROVSKI et al., 2011).

Alguns autores sugerem que a ativação dos receptores B₁ e B₂ esta diretamente envolvida com o estabelecimento de processos inflamatórios agudos e crônicos (MARCEAU e REGOLI, 2004). Isso por que a maioria dos efeitos observados durante um processo inflamatório agudo, como, por exemplo, vasodilatação, edema, dor e hiperalgesia, são resultantes da ativação do receptor B₂. Já em processos inflamatórios crônicos, observa-se que moléculas de cininas sofrem intensa ação de carboxipeptidases, havendo produção de grandes quantidades dos metabólitos des-Arg⁹-cininas. Essa alta concentração dos agonistas seletivos para o receptor B₁ sugere aumento importante de seus efeitos, os quais estão relacionados ao acréscimo na migração de leucócitos e na formação de edema, por exemplo (COSTA-NETO et al., 2008).

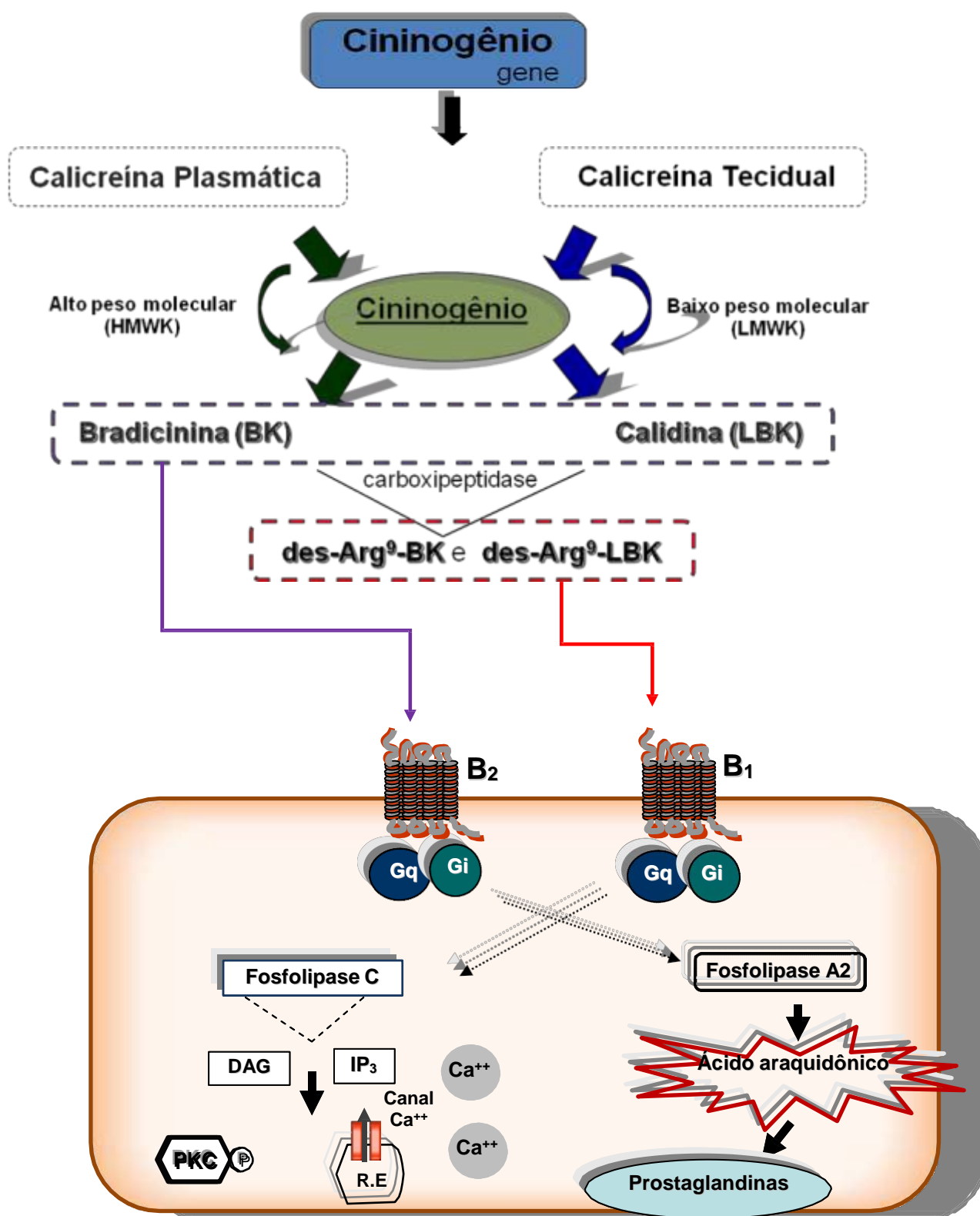


Figura 1. Representação da via de formação das cininas BK e LBK e seus metabólitos ativos, des-Arg⁹-BK e des-Arg⁹-LBK, assim como, mecanismos referentes à ativação dos receptores cininérgicos (B₁ e B₂) e suas principais vias de transdução após a ligação com seus respectivos agonistas.

O receptor B₁ possui um importante papel aumentando ou substituindo as atividades desencadeadas pela ativação do receptor B₂ (COSTA-NETO et al., 2008). Assim, a indução da expressão do receptor B₁ pode ser vista como um mecanismo para a amplificação do efeito tecidual das cininas, uma vez que, este receptor é geralmente expresso nos mesmos tipos celulares que está presente o receptor B₂ e recrutando a mesma via de sinalização, sem sofrer dessensibilização ou internalização (BOCK e LONGMORE, 2000; CALIXTO et al., 2000; MARCEAU e REGOLI, 2004). Além disso, sabe-se que a ativação de receptores B₂ leva a ativação de mecanismos de transdução responsáveis pelo aumento da população de receptores B₁, sugerindo a existência de um processo de balanço entre as duas populações de receptores cininérgicos, durante desordens inflamatórias ou após a ocorrência de injúrias (CALIXTO et al., 2000).

Existem diversas evidências indicando que as cininas são rapidamente geradas após lesão tecidual, estando diretamente relacionadas à indução da migração, proliferação, diferenciação e ativação de diversos tipos celulares, eventos esses, essenciais durante o processo de reparação tecidual (HALL e MORTON, 1997; CALIXTO et al., 2000). No entanto, apesar de diversos estudos demonstrarem o envolvimento das cininas em processos essenciais à elucidação de uma injúria tecidual, não existem ainda dados científicos que demonstrem a atuação desses mediadores no processo de cicatrização da pele, o que torna interessante a investigação da atuação das cininas durante a reparação cutânea, assim como sua influência sobre as células que compõe a pele (WIERNAS e DAVIS, 1998; GRECO et al., 2005; BURRELL et al., 2008; PIETROVSKI et al., 2011).

1.2 Processo de Cicatrização Cutâneo

A pele é o maior órgão do corpo humano e por sua localização externa está em contato direto com o meio ambiente, sendo sua principal função proteger o organismo de possíveis agressões externas, formando, portanto, uma barreira entre os órgãos internos e o ambiente externo. A pele é ainda o componente periférico do sistema imune, sendo capaz de iniciar uma resposta imune primária frente a um estímulo, como um patógeno. É na verdade um

órgão complexo que envolve diversos tipos celulares e estruturas, e pode ser dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; SPELLBERG, 2000).

A epiderme, por ser a camada mais externa é a responsável pela proteção contra traumas mecânicos, impedir a perda de água, e a entrada de possíveis patógenos provenientes do meio ambiente (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; DENNING, 2004). Nessa porção da pele os queratinócitos são os principais tipos celulares, e formam um epitélio estratificado pavimentoso constituído de cinco camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea. Essas células são formadas constantemente na camada basal e migram através das demais camadas enquanto sofrem processos de especialização e diferenciação celular. Quando estão próximas da superfície morrem e descamam. Sendo assim, a epiderme é uma estrutura bastante dinâmica (GNIADDECKI, 1998; GARTNER e HIATT, 1999). Na epiderme também podem ser encontrados os melanócitos, células responsáveis pela produção de pigmentos, como a melanina (DENNING, 2004). A epiderme não possui vasos sanguíneos, entretanto, está intimamente associada à derme através de uma lâmina basal, sendo, portanto, a derme responsável pelo suporte sanguíneo da epiderme (SPELLBERG, 2000).

A derme tem, portanto, dentre outras funções o aporte de nutrientes e de oxigênio para a epiderme, realizar a termorregulação e, além disso, células dessa camada têm papel fundamental em processos inflamatórios e cicatriciais (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007). Essa porção da pele é, por sua vez, subdividida em duas camadas, uma mais superficial e frouxa, denominada camada papilar, e uma mais profunda e densa, a camada reticular (GARTNER e HIATT, 1999). Essas camadas apresentam matrizes extracelulares com composições diferentes, na derme papilar as fibras de colágeno são pouco organizadas e finas, e consistem principalmente de colágeno do tipo III. Já na derme reticular a matriz é densa, com fibras mais grossas e organizadas, sendo encontradas principalmente fibras de colágeno do tipo I (SORRELL e CAPLAN, 2004; GARTNER e HIATT, 1999). Entre os componentes celulares existentes na derme encontram-se mastócitos, linfócitos e macrófagos, mas as

principais e mais abundantes células dessa região são os fibroblastos, que são os responsáveis por sintetizar colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e outras proteínas constituintes da matriz extracelular, ou seja, proteínas responsáveis pela estrutura, resistência e elasticidade da pele (MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; GARTNER e HIATT, 1999).

A perda da integridade tecidual devido à cirurgia, trauma, isquemia, queimadura ou outro tipo de agressão externa, podem promover alterações na morfologia da pele, resultando em lesão tecidual. Para que esta perda de integridade tecidual não prejudique a função protetora desempenhada por este tecido, logo após a ocorrência de uma lesão é iniciado um processo de cicatrização, com o objetivo de reparo tecidual (ALMEIDA, 2014). Assim, após a ocorrência de injúria tecidual uma cascata de eventos é iniciada, a qual vai mediar o processo de reparação tecidual e o restabelecimento da função protetora da pele (SUN, 2014).

A cicatrização é um processo extremamente dinâmico, e envolve interações complexas entre moléculas da matriz extracelular, mediadores solúveis, várias células residentes e leucócitos infiltrados (LAU et al., 2009). Para isso, o processo envolve três fases: Inflamação, Proliferação e Remodelamento tecidual, havendo regulação temporal destes processos. Quando não a regulação destas fases é ineficiente pode haver a formação de cicatrizes hipertróficas, quelóides ou cicatrizações crônicas (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011).

1.2.1 Fase Inflamatória

Lesões cutâneas causam, principalmente, danos celulares e em vasos sanguíneos. A perda de sangue após a ocorrência de uma lesão é reduzida graças a uma seqüência de eventos que se inicia logo após a ocorrência da injúria, sendo estes: vasoconstrição, agregação plaquetária e formação de coágulo (*clotting*) (THOMAS e O'NEILL, 1995).

Esse coágulo é formado basicamente de plaquetas inseridas em uma matriz formada de fibras de fibrina e fibronectina. Serve como tampão temporário para proteger o tecido exposto e também como matriz provisória

que permite a migração das primeiras células para que se inicie o processo de reparação. Além das funções já descritas, o coágulo atua como reservatório de fatores de crescimento e citocinas que são liberados durante a degranulação de plaquetas e esses mediadores irão recrutar células inflamatórias circulantes para o local da injúria (MARTIN e LEIBOVICH, 2005).

Assim, a agregação plaquetária é seguida por intensa infiltração de células inflamatórias no local da lesão. A inflamação é uma fase de extrema importância, pois é considerada instrumento para suprir o tecido de fatores de crescimento e citocinas que sinalizam os movimentos celulares e teciduais necessários para a reparação tecidual (VANCHERI et al., 2005; EMING et al., 2009). As primeiras células inflamatórias a chegarem ao local da injúria liberam mediadores como, histamina, serotonina e bradicinina, os quais são capazes de promover aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, dor e prurido, além de induzirem o recrutamento de mais células inflamatórias para o tecido lesionado (GREAVES et al., 2013).

Portanto, o processo inflamatório estabelecido após a ocorrência de lesão tecidual caracteriza-se por rápido acúmulo de células polimorfonucleares durante os dois primeiros dias. Já no terceiro dia, após a ocorrência da lesão, observa-se a redução do número de neutrófilos, os quais são substituídos por aumento do infiltrado de células fagocitárias mononucleares (SALEH et al., 1997). O infiltrado destas células inflamatórias está diretamente envolvido com a proteção do tecido lesionado contra a invasão de possíveis patógenos. Além disso, estas células também estão associadas à liberação de fatores de crescimento que irão induzir a ativação e a proliferação de células, como os fibroblastos, auxiliando na formação do tecido de granulação (SIMPSON e ROSS, 1972).

Os neutrófilos representam o principal leucócito polimorfonuclear observado durante a fase inflamatória, após a ocorrência de uma lesão tecidual. Possuem papel de proteção, onde são responsáveis por realizarem a fagocitose de possíveis patógenos e a “limpeza” do tecido, removendo fragmentos da matriz extracelular e celulares (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Neutrófilos expressam algumas proteases que possuem papel importante durante o processo de reparação tecidual. Como por exemplo, a

metaloproteinase 9 (MMP9), responsável pela degradação de diversos componentes da matriz extracelular, incluindo moléculas de actina, tubulina e anexinas. Esta atividade catabólica sinaliza um processo de reparação, induzindo resposta de renovação e reconstituição do tecido afetado (SIMPSON e ROSS, 1972).

A presença do infiltrado de polimorfonucleares também promove uma facilitação do recrutamento de monócitos para o tecido lesionado, uma vez que, a presença de neutrófilos apoptóticos representa um sinal capaz de atrair monócitos. Assim, por promover respostas de proteção e renovação, os neutrófilos contribuem de maneira direta para a reparação tecidual (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Após o recrutamento, monócitos oriundos da circulação periférica diferenciam-se em macrófagos, os quais possuem papel central em todas as diferentes fases do processo de reparação tecidual. Estes tipos celulares são responsáveis pela síntese e liberação de diversas citocinas e quimiocinas, que estimulam a formação de novos vasos e a síntese de colágeno durante a reparação tecidual. O número de macrófagos aumenta durante a fase inflamatória, tendo seu pico durante a fase de proliferação e redução durante a fase de remodelamento tecidual (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011).

Os macrófagos presentes no tecido lesado, durante o processo de cicatrização, podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o seu fenótipo e função. Os macrófagos ditos M1 são caracterizados por produzirem citocinas e mediadores inflamatórios, como o interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), óxido nítrico (NO) e interleucina-6 (IL-6). Macrófagos ativados pela interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) são chamados alternativamente de M2, os quais suprimem respostas inflamatórias e respostas imunológicas adaptativas. Esta população de macrófagos tem uma importante função durante o processo de cicatrização, uma vez que, induzem a angiogênese e a proliferação celular, além de também atuarem na defesa contra infecções (LAI et al., 2009; PLOEGER et al., 2013).

O predomínio dos diferentes fenótipos de macrófagos pode influenciar o processo de cicatrização em diferentes caminhos, dependendo do microambiente no qual estarão exercendo suas funções, havendo fina regulação da presença destes dois fenótipos durante as diferentes fases do

processo de cicatrização e sendo ambas as populações de macrófagos essenciais ao processo de reparo tecidual (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011). De uma maneira geral, as populações de macrófagos M1 encontram-se em maior número nas fases iniciais do processo de reparação, estando relacionados com a fagocitose de possíveis patógenos invasores e de *debris* celulares. Já os macrófagos M2 são predominantes nas fases tardias do processo de cicatrização, onde estão associados ao remodelamento tecidual (PLOEGER et al., 2013).

1.2.2 Fase Proliferativa.

A fase proliferativa é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito, caracterizando-se pela ocorrência de três eventos, a angiogenese, fibroplasia e reepitelização. Nesta fase há a formação de tecido de granulação, com o objetivo de preencher a área lesionada para restabelecer a integridade tecidual. Assim, o tecido de granulação é composto essencialmente por leito capilar, fibroblastos, macrófagos, frouxo arranjo de colágeno e fibronectina (MOUSSAD e BRIGSTOCK, 2000; SCHREML et al., 2010).

As próprias características anatômicas do tecido lesionado são capazes de estimular a migração e proliferação de células da pele, como queratinócitos e fibroblastos. Estes tipos celulares possuem potencial mitótico latente e com a ocorrência da lesão a inibição da proliferação decorrente do contato celular desaparece e a capacidade mitótica é restabelecida (HATANAKA e CURI, 2007). Além disso, a migração e ativação de fibroblastos e queratinócitos são intensificadas em decorrência da liberação de mediadores liberados por macrófagos, principalmente pelos M2 (HATANAKA e CURI, 2007).

O aumento do número de fibroblastos, além de ser essencial para o preenchimento do tecido lesado, está diretamente relacionado ao aumento da síntese de colágeno, culminando na formação de matriz extracelular mais forte e elástica. Este processo é denominado de fibroplasia, e para a sua eficiência é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sangüíneos (GREAVES et al., 2013). Após intensa atividade proliferativa com o objetivo de

compor o tecido de granulação, fibroblastos começam a se diferenciar em miofibroblastos, os quais são responsáveis por sintetizar e depositar componentes da nova matriz extracelular (SCHREML et al., 2010)

Os novos vasos formam-se a partir de vasos preexistentes, onde células endoteliais são estimuladas a proliferarem e a migrarem sobre a malha de fibrina depositada no leito da ferida. As cininas, prostaglandinas e outros mediadores químicos oriundos dos macrófagos são os principais responsáveis por estimular estas respostas celulares (EMING et al., 2007). Esse processo de angiogenese tem grande relevância durante a cicatrização, uma vez que, estes novos vasos são responsáveis por suprir de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (ENOCK e LEAPER, 2008; RODRIGUES et al., 2013).

A estruturação do tecido de granulação forma uma base sobre a qual queratinócitos presentes nas margens da lesão proliferam e migram em direção o centro da lesão com o objetivo de cobrir a superfície exposta e restabelecer a função protetora da pele, sendo este processo denominado reepitelização (GREAVES et al., 2013; SUN, 2014). Assim, durante a reepitelização os queratinócitos se desprendem da camada basal e migram em direção ao local da lesão, reduzindo a superfície exposta. No local onde se forma o coágulo os queratinócitos migram e proliferam através da matriz provisória até que uma monocamada epidérmica seja estabelecida, e então as fases migratórias e proliferativas cessam e inicia-se a fase de diferenciação celular, objetivando o restabelecimento de todas as camadas da epiderme (GILLITZER e GOEBELER, 2001; GURTNER et al., 2008; HU et al., 2014).

Durante todo o processo de reparação interações entre diversos tipos celulares proporcionam a coordenação de eventos individuais, permitindo um controle espacial e temporal. Nas fases médias e tardias da cicatrização, as interações celulares são dominadas pela ação recíproca de queratinócitos e fibroblastos, os quais gradualmente substituem o microambiente inflamatório pelo tecido de granulação. Essa interação entre derme e epiderme é capaz de regular a homeostasia da pele e parte da resposta de cicatrização (THOMAS; O'NEILL, 1995; SCHREML et al., 2010).

1.2.3 Fase de Remodelamento Tecidual.

Durante a fase de remodelamento tecidual ocorre a maturação da ferida, caracterizando-se por aumento da resistência do tecido lesionado. Nessa fase do processo de cicatrização ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Desta forma, a fase é marcada principalmente por alterações na matriz extracelular, principalmente, pela transição da deposição de colágeno do tipo III para o do tipo I, assim como o rearranjo destas fibras (SHOULDERS e RAINES, 2009).

O remodelamento das fibras de colágeno envolve a atividade de metaloproteinases e alteração do perfil de síntese e deposição de colágeno no local da injúria (LI et al., 2007; SUN, 2014). Havendo, portanto, equilíbrio entre a produção, quebra e rearranjo das fibras de colágeno na matriz extracelular. Desequilíbrios nestes processos podem resultar em defeitos cicatriciais importantes, levando ao aparecimento de quelóides, por exemplo (SCHREML et al., 2010; SUN, 2014).

A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células e da hidroxilação da prolina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelos próprios fibroblastos, em presença de co-enzimas, vitaminas A, C e E, ferro, testosterona e zinco (SHOULDERS e RAINES, 2009). Nesta fase, os principais responsáveis pela síntese dos componentes da matriz extracelular são os miofibroblastos (FRIMM et al., 1996).

Os miofibroblastos são um fenótipo alternativo de fibroblastos, sendo a transição destes dois estados mediada, principalmente, pelo fator de crescimento de transformante β (TGF- β) (WERNER *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que os miofibroblastos começam a aparecer no tecido de granulação a partir da fase intermediária da cicatrização, o que coincide com forte indução das propriedades contráteis e tensão mecânica observadas nesse período. Uma vez que, os miofibroblastos possuem características contráteis, o aumento do número destas células durante a fase de remodelamento está diretamente associado à contração da lesão, por meio de movimento centrípeto de toda a espessura da pele circundante, reduzindo o tamanho da cicatriz (THOMAS e O'NEILL, 1995).

A síntese, a deposição e a remodelagem da matriz extracelular são indispensáveis para a resolução do reparo tecidual. As respostas teciduais às lesões envolvem interações diretas entre as células e, entre células e a matriz extracelular, assim como, *crosstalk* indireto entre diferentes populações celulares através de mediadores solúveis. Então, o cuidadoso balanço entre mediadores inibitórios e estimulantes durante as diferentes fases da reparação são essenciais para alcançar a homeostasia do tecido após uma lesão (GILLITZER e GOEBELER, 2001; EMING, 2007; MARTIN, 1997).

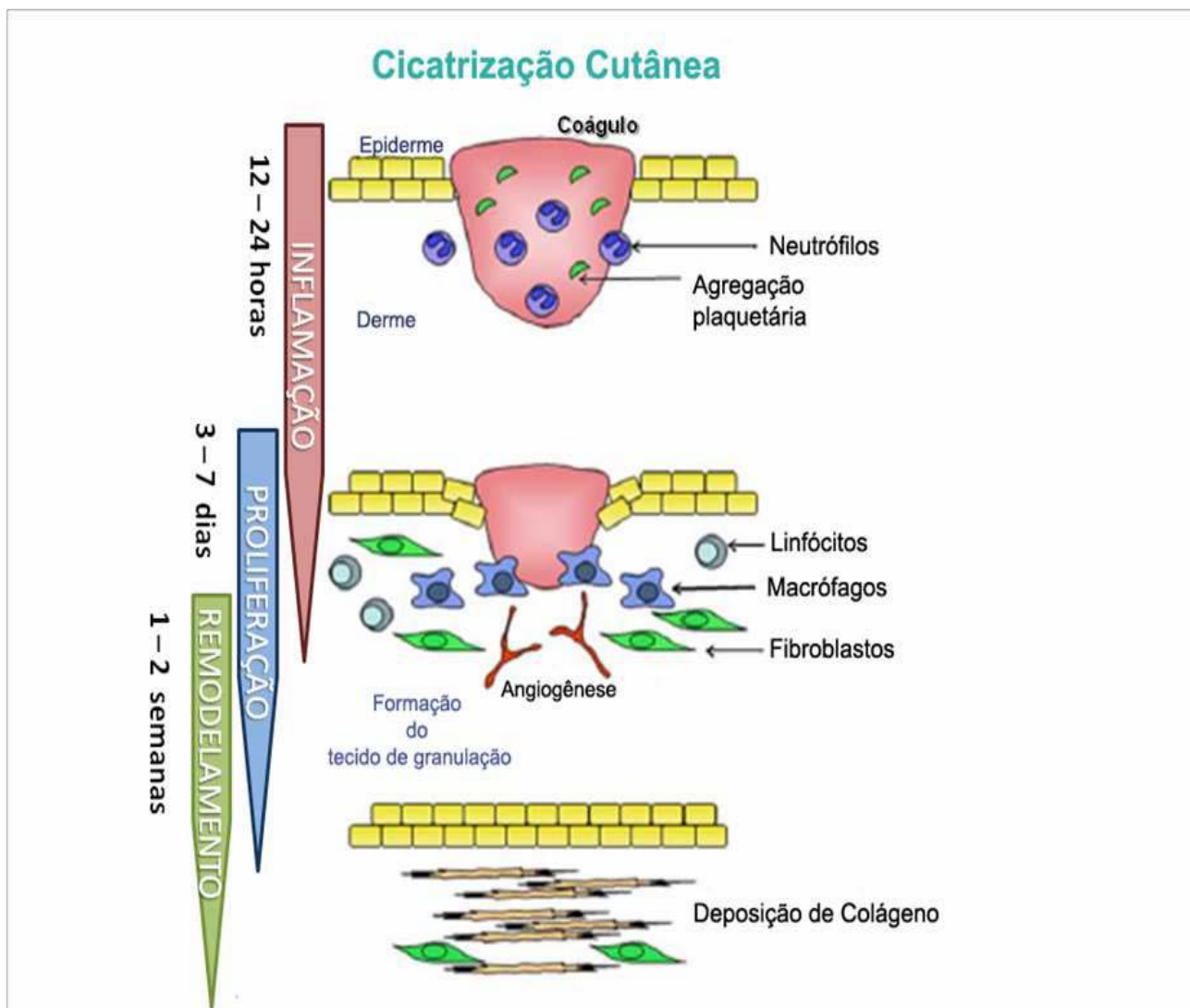


Figura 2. Representação das diferentes fases que compõem o processo de cicatrização cutânea, assim como, os principais eventos celulares que caracterizam cada uma destas fases. Sendo a fase inflamatória caracterizada por intenso influxo de neutrófilos e macrófagos, a fase proliferativa composta por processos de reepitelização, fibroplasia e angiogenese e o remodelamento tecidual pela produção, digestão e rearranjo das fibrilas de colágeno (adaptado de KONDO e ISHIDA, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, vários estudos tem sido realizados no sentido de identificar substâncias capazes de favorecer o reparo tecidual. Avanços na compreensão da base molecular e celular que compõem o processo de cicatrização cutâneo têm auxiliado na busca por alternativas terapias e métodos profiláticos que visem acelerar o processo de reparo, contribuindo para o restabelecimento da homeostasia do organismo e reduzir possíveis complicações (SUN, 2014).

O principal problema encontrado durante o desenvolvimento de uma terapia que possa auxiliar o processo de reparação tecidual diz respeito à dificuldade de definir em qual das fases do processo de cicatrização será empregado o possível fármaco (THOMAS e O'NEILL, 1995). Isso por que, dependendo da etapa, determinadas células e mediadores possuem relevância mais destacada, sendo importante o conhecimento cronológico da lesão (BALBINO et al., 2005).

Atualmente, são largamente empregadas no tratamento de injúrias teciduais substâncias contendo agentes enzimáticos, como pomadas a base de collagenase, os quais auxiliam na remoção de fragmentos da matriz extracelular oriundos da ocorrência da lesão. Contudo, estas práticas apresentam baixa eficácia (BALBINO et al., 2005). Dentre algumas das substâncias que possuem maior eficácia na intervenção do processo de reparo, destacam-se alguns fatores de crescimento que, quando aplicados topicamente sobre a ferida, demonstram boa capacidade de acelerar o reparo tecidual em experimentos animais (MORIYA, 2008). Um exemplo é o "*becaplermin*", produto desenvolvido a base do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e que tem capacidade de interferir diretamente no processo de cicatrização, onde pode auxiliar no influxo de células inflamatórias, reepitelização, fibroplasia e angiogenese. Porém, estas são intervenções terapêuticas com alto custo, que se encontram distantes da realidade socioeconômica da maioria da população (MANDELBAUM et al., 2003).

Além disso, sabe-se que técnicas simples como a manutenção de um ambiente limpo no local da injúria, ajuda a acelerar a reepitelização e reduz riscos do estabelecimento de processos inflamatórios. Assim como, a

estimulação elétrica auxilia na migração de diferentes tipos celulares, favorecendo processos de fibroplasia e reepitalização, através da criação de um campo elétrico na região da lesão (SUN, 2014). Mesmo assim, ainda não existe nenhum método de referência no tratamento de lesões cutâneas, o que também é influenciado pelo pouco conhecimento dos diversos processos que compõem a reparação tecidual.

Pensando na melhor compreensão a respeito de alguns mediadores inflamatórios e também na busca de novos alvos para a terapêutica, as cininas tornaram-se interessantes nesta perspectiva. São peptídeos com atividade pró-inflamatória bem estabelecida e pouco se conhece a respeito de sua participação no processo de cicatrização, especialmente na pele. Assim, a compreensão da atividade desses mediadores na reparação cutânea poderia elucidar mecanismos desconhecidos, além de fazer dos receptores das cininas possíveis alvos terapêuticos. Nesse contexto, o desenvolvimento e utilização de animais nocautes têm auxiliado e revelado o envolvimento de diferentes moléculas no processo de cicatrização. Auxiliando, desta maneira, na compreensão destes processos celulares e no estabelecimento de novos alvos terapêuticos (THOMAS et al., 1995; GROSE e WERNER, 2004; SCHREML et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o processo de cicatrização cutânea em camundongos nocaute para os receptores B₁ (KOB₁), B₂ (KOB₂) e duplo nocaute (KOB₁B₂), objetivando compreender a participação desses receptores no processo de reparo tecidual.

3.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a contração da ferida em camundongos nocaute para os receptores das cininas submetidos ao modelo de cicatrização de pele por excisão, e comparar com o processo em camundongos *wild type* (WT), usados como controle.
- 2- Analisar o efeito da ausência dos receptores das cininas na qualidade da cicatriz, através da avaliação dos níveis teciduais de hidroxiprolina.
- 3- Investigar parâmetros essenciais à reparação tecidual, como: infiltrado celular e taxa de reepitelização, através de análise histológica, em animais nocautes para os receptores das cininas e WT.
- 4- Avaliar alterações na proliferação e diferenciação celular, a partir de amostras teciduais da lesão de camundongos nocautes para os receptores das cininas e WT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da variedade C57BL/6 (WT e nocautes), cedidos pelo Professor Dr. João Bosco Pesquero, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. A deleção da sequência de codificação do receptor B₁, B₂ e de ambos os receptores foi obtida e descrita previamente por Pesquero *et al.* (2000), Borkowski *et al.* (1995) e Cayla *et al.* (2007), respectivamente. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), respeitando uma fase claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Ao menos uma hora antes da realização dos experimentos os animais foram transferidos e mantidos na sala de experimento para adaptação.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná sob o número 531. Além disso, para realização dos modelos animais foram levadas em consideração diretrizes experimentais subscritas em *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments Guidelines)*, objetivando reduzir fatores que possam vir a promover variações nos resultados, e contribuindo para posteriores replicações dos resultados (KILKENNY *et al.*, 2010).

4.2. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO PELO MÉTODO DE EXCISÃO.

Objetivando verificar a participação das cininas no processo de cicatrização da pele, animais WT e nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) foram submetidos ao modelo de avaliação de cicatrização pelo método de excisão cutânea. Os animais tiveram a região

dorsal tricotomizada, aproximadamente 24 horas antes da realização das cirurgias. Posteriormente, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, ip.) e com o auxílio de um *punch* de biópsia (6 mm de diâmetro) foi realizada uma excisão cutânea. A excisão circular é realizada no dorso dos animais, região que dificulta que os mesmos consigam lamber a ferida, reduzindo assim, algum possível caso de irritação ou infecção (LIM *et al.*, 2004). Individualmente, cada ferida foi mensurada diariamente, com o auxílio de uma transparência, sendo considerado o dia da realização do processo operatório como “dia zero”, o qual serve como padrão de referência do início do processo de cicatrização a ser comparado com os demais dias avaliados.

O fechamento da ferida foi quantificado utilizando o *software* “*Image Tool 3.0*”. Assim, a taxa de cicatrização foi expressa através da avaliação da área da ferida, comparada com a área inicial da ferida. Sendo a redução da área da injúria um indicativo da taxa de cicatrização cutânea. No decorrer do experimento e ao final, os animais foram eutanasiados e amostras do tecido contendo as cicatrizes foram coletadas para análises posteriores.

4.3. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TECIDUAL DE HIDROXIPROLINA.

A quantificação de hidroxiprolina permite a determinação indireta do conteúdo de colágeno total no tecido (REDDY e ENWEMEKA, 1996). Para tanto, amostras de tecido contendo as cicatrizes (6 mm) foram homogeneizadas em solução salina 0,9% e congeladas a -70°C, sendo posteriormente submetidas ao processo de liofilização. Em seguida, 0,6 mg do produto deste liofilizado foram submetidos à hidrólise alcalina em 2 mol/L de NaOH. Uma alíquota de 50 µL do hidrolisado foi conduzido a um processo de oxidação com Reagente Oxidante de Cloramina T. Por fim, foram adicionados 500 µL de Reagente de *Ehrlich*, que se complexa com a hidroxiprolina presente na amostra, gerando uma reação colorimétrica, sendo a intensidade da coloração proporcional à quantidade de hidroxiprolina tecidual. A leitura da absorbância foi realizada em 550 nm.

4.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA.

Amostras de tecido, contendo as cicatrizes, foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por um período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma desidratação seriada, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm e coradas com Tricrômio de Masson.

O preparo histológico das amostras possibilita a avaliação de alguns parâmetros como, taxa de reepitelização e infiltração celular, em áreas representativas com aumento de 200x e 400x, respectivamente. Estas análises foram realizadas com o auxílio do *software* “ImageJ” e a taxa de reepitelização mensurada a partir da diferença entre a área final e inicial da lesão. Para tais análises, as imagens histológicas foram obtidas através do *Scanner Zeiss Axio Imagen Z2*, *Software Metafer 4*, câmera Cool Cob 1 – *Metasystems*.

4.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.

Amostras de tecido contendo a cicatriz foram coletadas dos animais submetidos ao modelo de cicatrização por excisão, emblocadas em parafina (como descrito no item 4.4) e seccionadas em cortes de 5 µm. Estes cortes histológicos foram montados em lâminas contendo filme de silano 2%. Posteriormente, as lâminas foram então submetidas a banhos de xilol para desparafinização e em seguida hidratados com banhos sucessivos, em concentrações decrescentes de álcool. Em seguida as lâminas foram submetidas a um banho de glicina 0,1 M para o bloqueio dos radicais aldeídos, enquanto a peroxidase endógena e os sítios inespecíficos foram bloqueados com banhos de H₂O₂ 3% em metanol e PBS/BSA 1%, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpos anti-PCNA (1:100), ou anti α-SMA (1:300), durante duas horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após banho com PBS, as lâminas foram novamente incubadas, desta vez com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:100), durante uma hora a temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com kit contendo o cromógeno DAB durante 15 minutos.

Em seguida, as lâminas foram lavadas, contracoradas com hematoxilina e os cortes submetidos à desidratação com banhos sucessivos de álcool em concentrações crescentes. A presença de células imunomarcadas positivamente para PCNA ou α -SMA foram quantificadas a partir de áreas representativas, utilizando imagens capturadas em microscopia óptica, com aumento de 400x. A quantificação foi realizada através da contagem do número de células positivas por campo, sendo analisados 12 campos de 3 cortes histológicos distintos por lâmina, e três lâminas por animal, havendo 3 animais por grupo.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e avaliados por análise de variância com um critério (ANOVA – uma via), seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados utilizando o Programa estatístico GraphPad Prism versão 6 (San Diego, California EUA).

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA TAXA DE CICATRIZAÇÃO

A fim de verificar a participação das cininas no processo de cicatrização de pele, animais nocautes para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) foram submetidos ao modelo de avaliação da cicatrização pelo método de excisão, assim como animais WT utilizados como controle. A redução da área da ferida é um indicativo da taxa de cicatrização da pele, desta maneira os resultados demonstram que no décimo dia após a excisão, os animais WT apresentaram oclusão da ferida igual a $96,13 \pm 0,55\%$, enquanto os grupos nocaute KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂ apresentaram fechamento da ferida igual a $91,39 \pm 0,93\%$, $86,80 \pm 1,93\%$ e $82,0 \pm 1,73\%$, respectivamente (Figura 3).

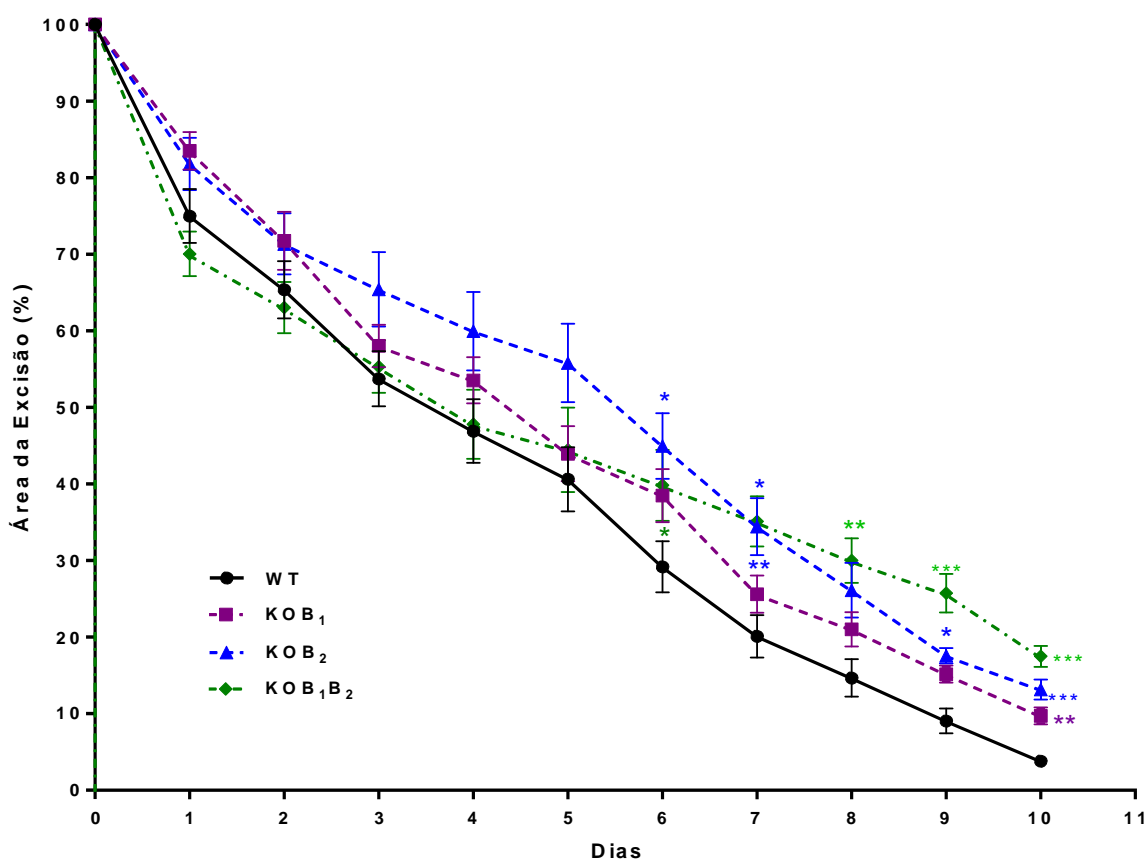


Figura 3. Análise da taxa de cicatrização cutânea em animais nocaute (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. Os animais foram anestesiados, tricomizados e com o auxílio de um *punch* para biópsia foi realizada uma excisão cutânea de 6 mm de diâmetro no dorso dos animais, sendo realizadas mensurações diárias das lesões. Os pontos representam a média das áreas das excisões (8 – 12 animais) ao longo dos dez dias de experimento, sendo o dia 0 considerado 100%. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT.

Durante o período de avaliação do processo de cicatrização, além das mensurações, foram realizados registros fotográficos em dias referentes às diferentes fases do processo de cicatrização. Sendo estas: Fase Inflamatória (2º, 3º dias), Fase Proliferativa (7º dia) e Fase de Remodelamento Tecidual (10º dia). A partir destes registros é possível visualizar que o fechamento da lesão cutânea nos animais nocaute é diferente do observado no grupo controle (WT), sendo esta diferença observada em todas as fases do processo de reparo tecidual. A Figura 4 mostra fotos representativas das feridas em diferentes períodos e nos diferentes grupos de animais, onde é possível

observar o atraso na contração da lesão nos grupos nocaute, principalmente, ao décimo dia de avaliação (Figura 4).

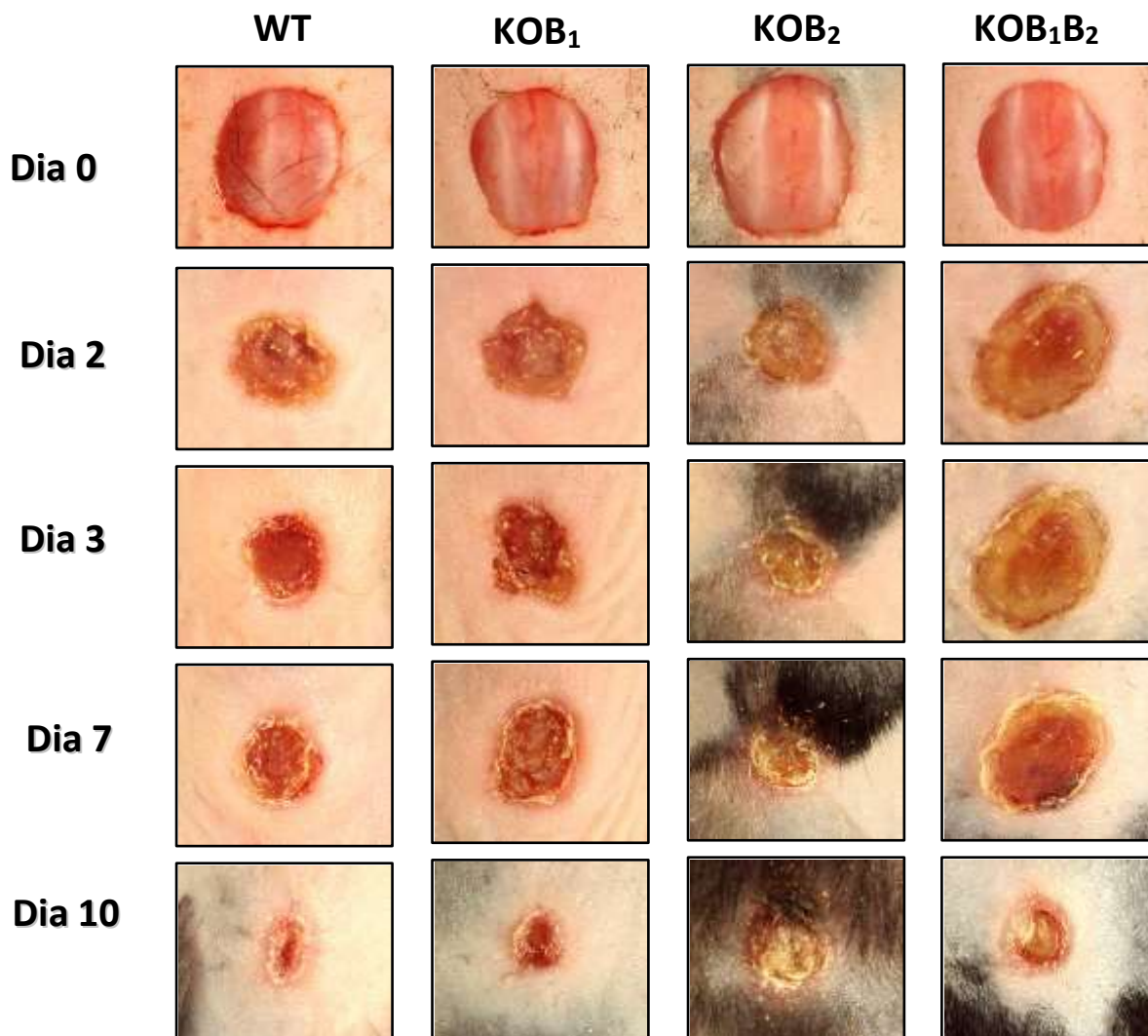


Figura 4. Fotos representativas do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB_1 , KOB_2 e KOB_1B_2) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. Fotos representativas da excisão de animais nocaute e WT submetidos ao modelo de excisão cutânea, sendo consideradas as diferentes fases do processo de cicatrização: fase inflamatória (2 °, 3 ° dias), fase proliferativa (7 ° dia) e fase de remodelamento tecidual (10 ° dia).

Uma vez que, os resultados mostraram que os animais nocaute para os receptores das cininas (KOB_1 , KOB_2 e KOB_1B_2) apresentaram atraso com relação à contração da lesão em comparação aos animais WT, foi realizada a avaliação do período de oclusão total das feridas nestes grupos (Figura 5A). Assim, observou-se que as diferenças detectadas anteriormente se mantiveram

diferentes períodos de resolução das lesões foram observados entre os grupos. Os animais controle WT apresentaram em média o fechamento completo de suas lesões no 12º dia após a realização da excisão, já os animais nocaute tiveram suas lesões elucidadas no 17º (KOB₁), 21º (KOB₂) e 23º dia (KOB₁B₂) (Figura 5B).

Com o objetivo de verificar a ocorrência de possíveis alterações durante o processo de reparo tecidual, amostras teciduais foram coletadas durante as diferentes fases do processo de cicatrização (2º e 3º dias - Fase inflamatória, 7 º - Fase Proliferativa, e 10 º - Fase de Remodelamento Tecidual), e submetidas a posteriores análises.

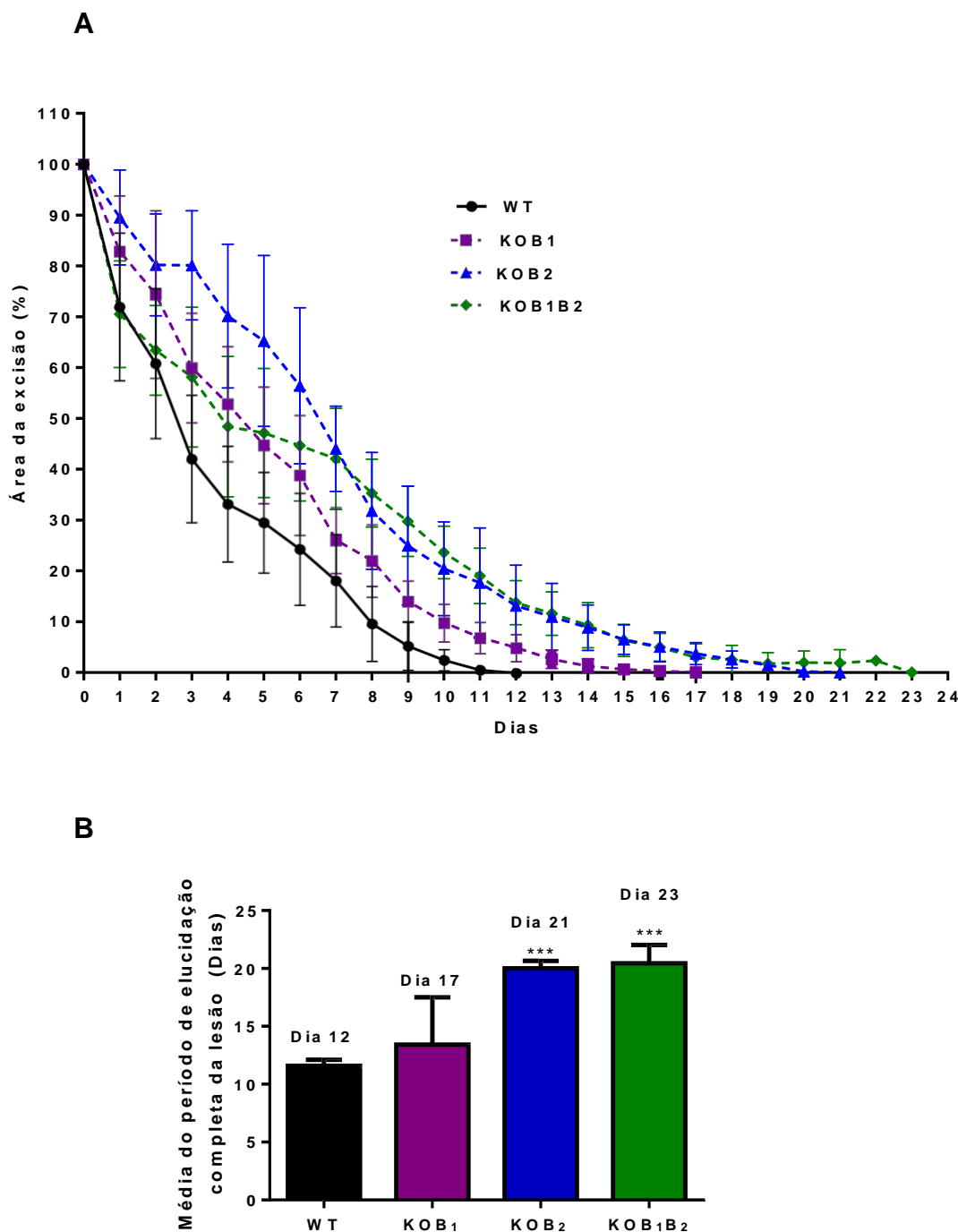


Figura 5. Avaliação do período de resolução da lesão de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. (A) Os animais foram anestesiados, tricomizados e com o auxílio de um *punch* para biópsia foi realizada uma excisão cutânea de 6 mm de diâmetro, sendo realizadas mensurações diárias das lesões até sua resolução. Os pontos representam a média das áreas das excisões (3 – 5 animais) ao longo dos dias de experimento, sendo o dia 0 considerado 100%. (B) Média de dias necessários para a resolução da lesão cutânea nos grupos nocaute e controle. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT.

5.2. INFLUÊNCIA DO SISTEMA DAS CININAS SOBRE O INFILTRADO CELULAR.

Objetivando averiguar uma possível participação das cininas sobre o infiltrado de células inflamatórias no tecido lesionado, foram realizadas quantificações a partir de análise histológica de amostras teciduais coletadas no 2° e 3° dia, após a realização da excisão cutânea (Figura 6).

Os resultados mostraram redução do número de leucócitos infiltrados durante a fase inflamatória nos grupos nocaute para os receptores cininérgicos. Sendo esta redução de $30,65 \pm 3,66\%$ (KOB₁), $48,20 \pm 2,52\%$ (KOB₂) e $47,72 \pm 2,29\%$ (KOB₁B₂), no 2° dia após a realização do processo operatório. A alteração no influxo celular nos nocautes permaneceu no 3° dia após a excisão, de $44,26 \pm 7,79\%$ (KOB₁), $67,19 \pm 2,88\%$ (KOB₂) e $60,03 \pm 4,28\%$ (KOB₁B₂), ambos comparados ao grupo WT (Figura 7).

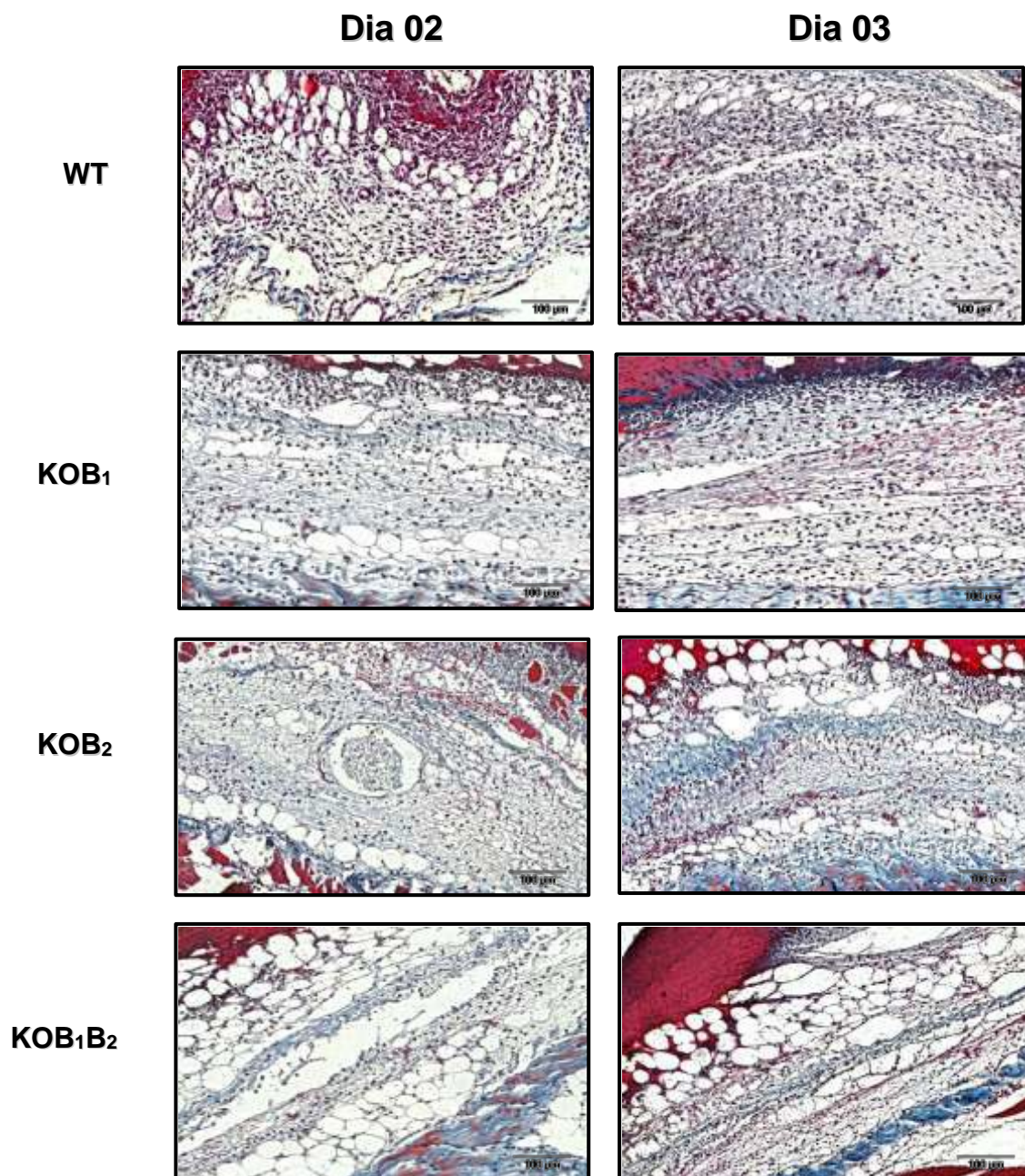


Figura 6. Fotos representativas do infiltrado celular presente durante a fase inflamatória (2° e 3° dia) do processo de reparação tecidual em animais nocautes para os receptores de cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. As amostras teciduais foram coletadas no 2° e 3° dia após a realização da excisão cutânea, com o auxílio de um *punch* (6 mm). Em seguida as amostras foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em cortes de 5 µm, e submetidas à coloração com Tricrômio de Masson, 400x.

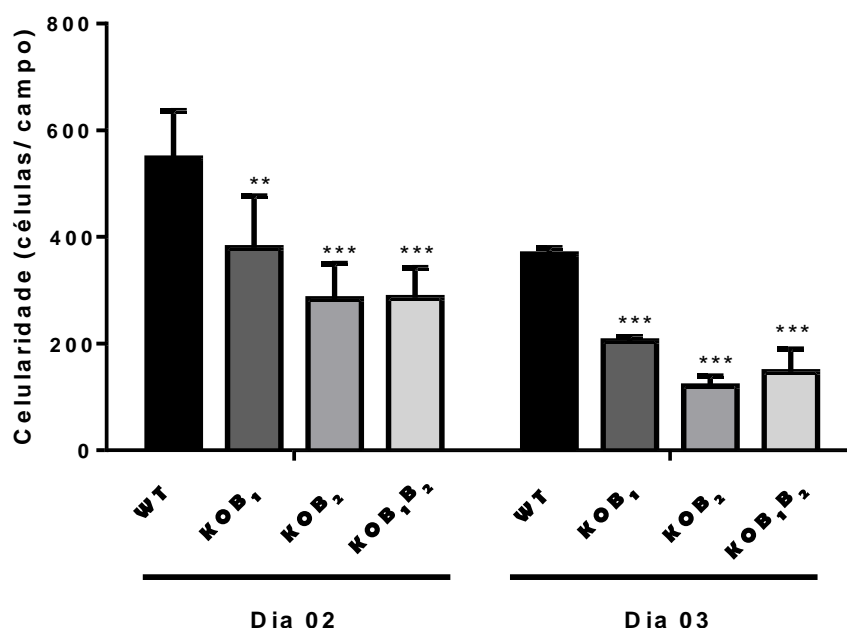


Figura 7. Quantificação do infiltrado celular presente durante a fase inflamatória do processo de cicatrização em animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. A análise da migração leucocitária para o local da injúria foi realizada a partir da avaliação de imagens representativas obtidas de lâminas histológicas de amostras teciduais coletadas no 2° e 3° dia após a realização da excisão, e referentes à fase inflamatória do processo de reparo tecidual. A quantificação do influxo celular foi realizada com o auxílio do *software* “Image J”, onde foram avaliados 12 campos de 3 cortes histológicos distintos por lâmina, e três lâminas por animal, havendo 3-5 animais por grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Newman-Keuls*. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT.

5.3. AVALIAÇÃO DA TAXA DE REEPITELIZAÇÃO

A taxa de reepitelização corresponde a uma quantificação indireta da taxa de migração e proliferação dos queratinócitos durante o processo de reparação tecidual. A partir de mensurações realizadas durante as diferentes fases do processo de cicatrização (Fase inflamatória, Fase proliferativa e Fase de remodelamento tecidual), os resultados mostraram significativas reduções da taxa de reepitelização nas fases iniciais e tardias do processo de cicatrização dos grupos nocaute KOB₂ e KOB₁B₂, em comparado ao grupo WT (Figura 8).

No 2º dia, após a realização da excisão, foram observadas reduções na taxa de reepitelização $25,33 \pm 3,59\%$ (KOB_2) e $37,31 \pm 4,21\%$ (KOB_1B_2). No terceiro dia do processo de cicatrização este perfil se manteve, havendo inibições iguais a $37,37 \pm 5,53\%$ (KOB_2) e $38,55 \pm 4,49\%$ (KOB_1B_2), ambos comparados ao grupo WT.

Durante a fase proliferativa (7º dia) as reduções permaneceram, sendo de $24,94 \pm 8,45\%$ (KOB_2) e $23,63 \pm 5,41\%$ (KOB_1B_2). No 10º dia a interferência na taxa de reepitelização, comparado com o grupo controle ($97,25 \pm 0,47\%$), foi igual a $29,08 \pm 6,4\%$ (KOB_2) e $26,62 \pm 3,8\%$ (KOB_1B_2). Além disso, mensurações realizadas a partir de amostras coletadas de animais nocaute para o receptor B_1 não mostraram diferenças na taxa de reepitelização quando comparados ao grupo controle WT.

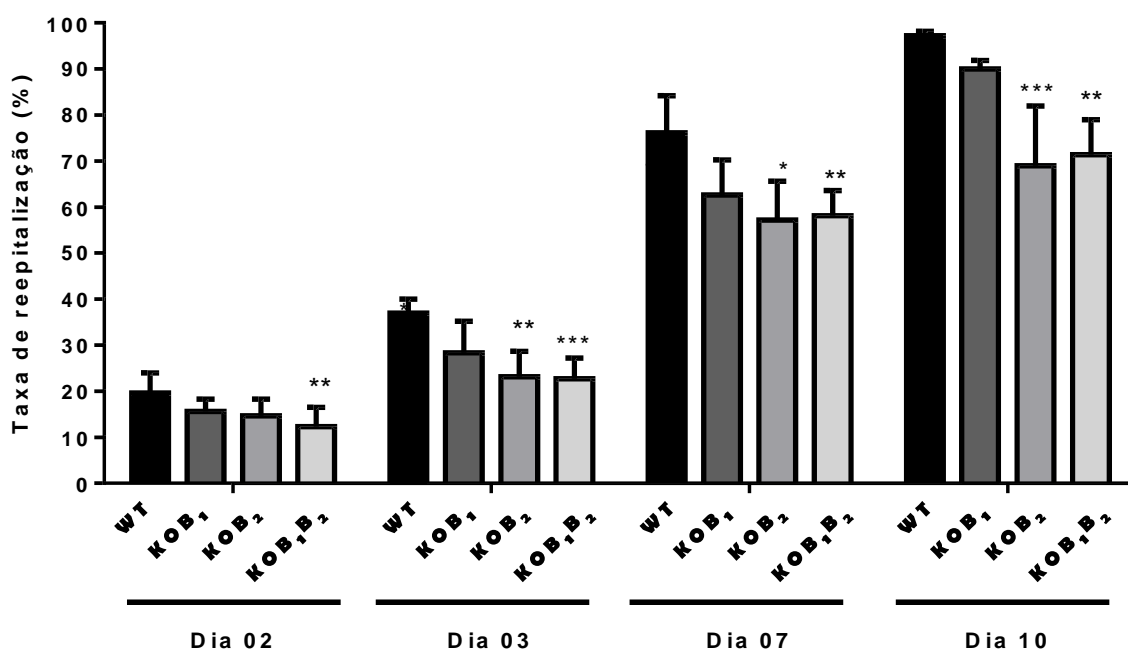


Figura 8. Avaliação da taxa de reepitelização em animais nocaute para os receptores das cininas (KOB_1 , KOB_2 e KOB_1B_2) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. A análise da taxa de reepitelização foi realizada a partir da avaliação de imagens representativas obtidas de lâminas histológicas de amostras teciduais coletadas ao longo das diferentes fases do processo de cicatrização (Fase Inflamatória -2º, 3º dias, Fase Proliferativa -7º dia e Fase de Remodelamento Tecidual -10º dia). A taxa de reepitelização foi mensurada a partir da diferença entre a área final e inicial da lesão com o auxílio do *software* "ImageJ", sendo avaliadas três lâminas por animal, havendo 3-5 animais por grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT.

A Figura 9 apresenta fotos representativas obtidas a partir de amostras teciduais coletadas no 10º dia após a realização da injúria e possibilita a observação de diferenças com relação ao processo de contração das feridas e na estruturação do tecido de granulação. A partir das imagens é possível visualizar que os animais KOB₂ e KOB₁B₂ exibem atraso na taxa de reepitelização (flechas), em comparação ao grupo WT.

Já com relação ao tecido de granulação, a ausência dos receptores das cininas resultou em desestruturação na formação deste tecido nos grupos nocaute, quando comparados com os animais WT (Figura 9). A formação anormal deste tecido pode ter sido resultado de alterações durante o processo de reparo, possivelmente em algum dos eventos característicos da fase proliferativa, como fibroplasia ou angiogenese. Assim, os receptores cininérgicos parecem estar associados a alguns desses eventos, uma vez que, o aumento do número de fibroblastos e os novos vasos sanguíneos são os principais responsáveis por compor o tecido de granulação.

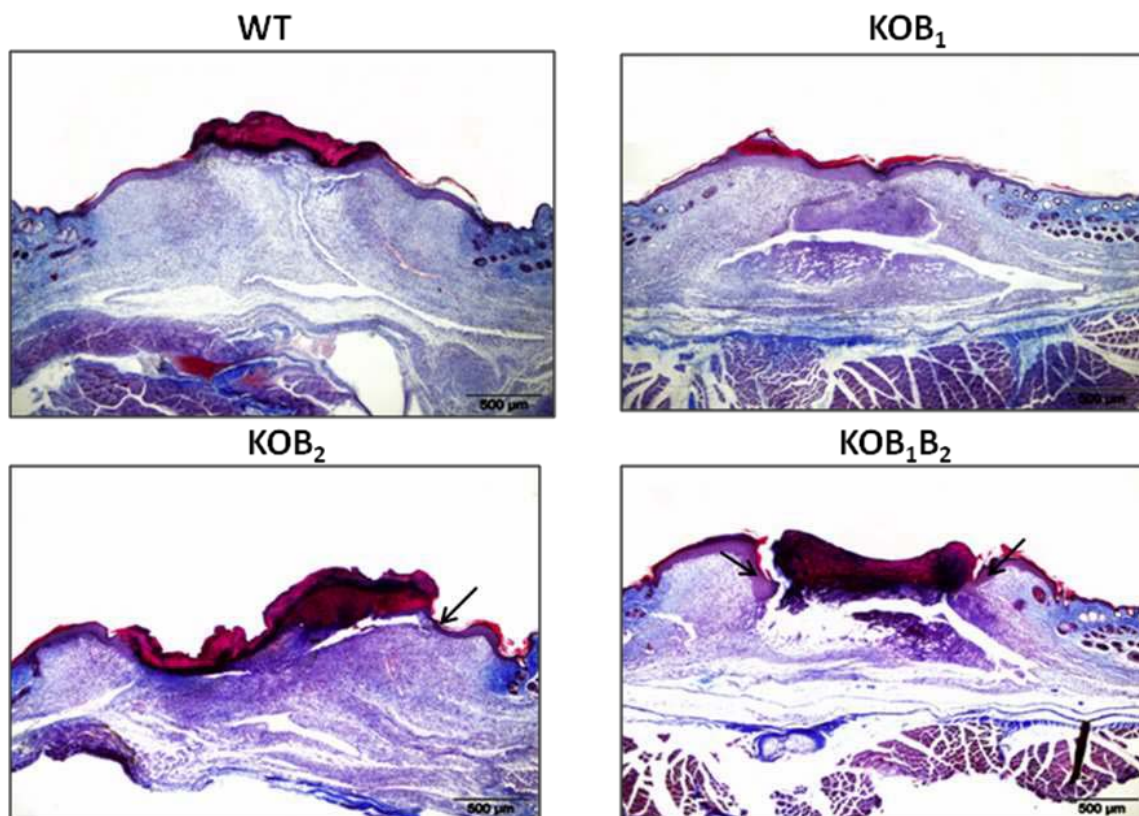


Figura 9. Fotos representativas da histologia de amostras teciduais coletadas durante a fase de remodelamento do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB_1 , KOB_2 e KOB_1B_2) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. As amostras teciduais foram coletadas no décimo dia após a realização do processo cirúrgico, com o auxílio de um *punch* (6mm). Posteriormente, foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em contes de 5 μ m e coradas com Tricrômio de Masson, aumento de 200x. Flechas indicam regiões em que o processo de reepitelização encontra-se atrasado nos grupos KOB_2 e KOB_1B_2 , quando comparados ao grupo WT.

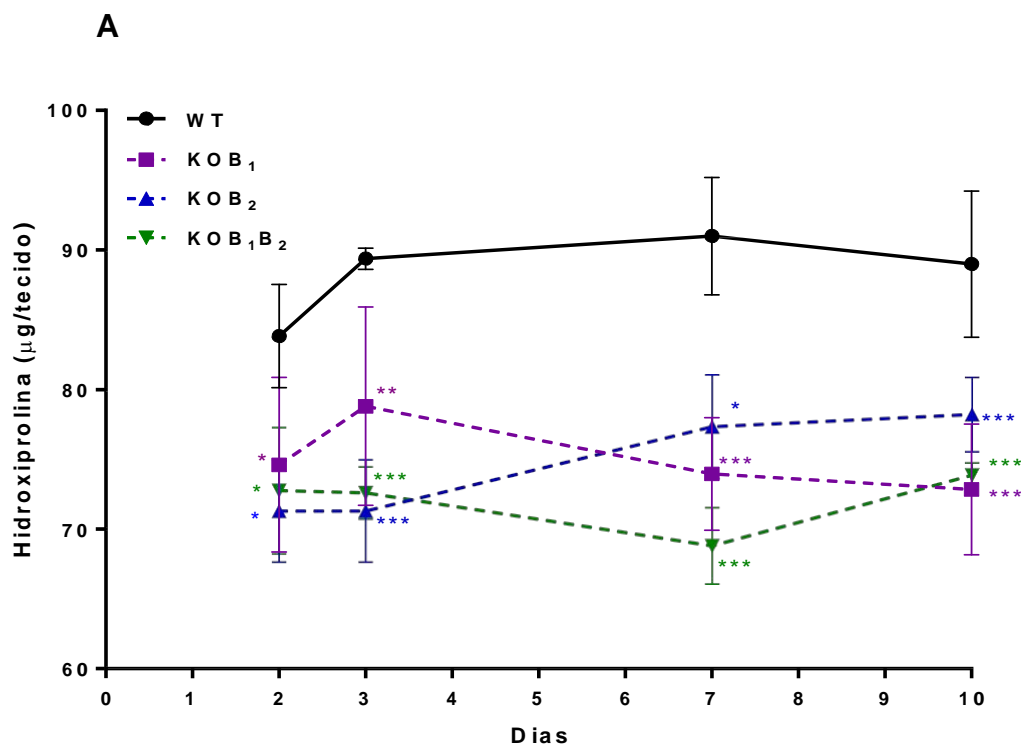
5.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS TECIDUAIS DE COLÁGENO

A partir da quantificação do conteúdo de hidroxiprolina é possível determinar os níveis de colágeno tecidual e verificar possíveis diferenças na expressão e/ou deposição de colágeno entre os grupos. Desta forma, foram realizadas análises dos níveis de hidroxiprolina a partir de amostras teciduais contendo as cicatrizes, coletadas durante as diferentes fases do processo de cicatrização.

Como demonstrado na Figura 10A, os animais nocaute apresentaram reduções significativas dos níveis de hidroxiprolina tecidual em todas as fases do processo de cicatrização. No 2º dia após a realização da excisão, a taxa de hidroxiprolina tecidual nos animais nocaute foi menor do que nos animais WT ($83,82 \pm 1,84 \mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido), sendo esta redução de $10,99 \pm 3,12\%$ (KOB₁) $14,88 \pm 1,81\%$ (KOB₂) e $13,16 \pm 2,24\%$ (KOB₁B₂). No 3º dia, essas alterações permaneceram iguais a $11,81 \pm 4,1\%$ (KOB₁), $14,93 \pm 2,77\%$ (KOB₂) e $18,72 \pm 0,83\%$ (KOB₁B₂), quando comparado ao grupo controle ($89,36 \pm 0,44 \mu\text{g}/\text{tecido}$).

No 7º dia após a excisão as inibições na quantidade de hidroxiprolina tecidual se mantiveram em todos os grupos nocautes em $16,27 \pm 2,01\%$ (KOB₁), $15,58 \pm 1,84\%$ (KOB₂) e $22,70 \pm 1,57\%$ (KOB₁B₂). Assim seguiu no 10º dia, sendo as reduções da taxa de hidroxiprolina nos grupos nocaute de $18,13 \pm 2,7\%$ (KOB₁), $12,11 \pm 1,52\%$ (KOB₂) e $16,96 \pm 0,51\%$ (KOB₁B₂), em comparação com o grupo controle ($88,9 \pm 2,62 \mu\text{g}/\text{tecido}$).

Em amostras coletadas após a resolução da lesão tecidual observou-se que as diferenças com relação ao conteúdo de hidroxiprolina, mensuradas durante as diferentes fases do processo de cicatrização, persistiram após o fechamento completo da excisão (Figura 10B). Assim, o percentual de hidroxiprolina tecidual observado nos animais WT foi de $88,89 \pm 3,42 \mu\text{g}/\text{tecido}$, sendo detectadas nos grupos nocautes reduções de $16,27 \pm 1,94\%$, $15,59 \pm 1,85\%$ e $22,67 \pm 0,52\%$, respectivamente para KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂.



B

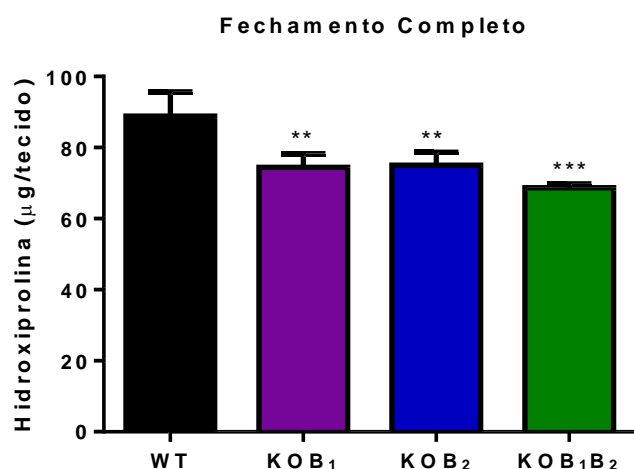


Figura 10. Quantificação dos níveis de hidroxiprolina em amostras teciduais de animais nocaute (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. (A) Amostras de tecido contendo a cicatriz foram coletadas dos animais submetidos ao modelo de cicatrização cutânea, com o objetivo de verificar possíveis diferenças referentes aos níveis de hidroxiprolina tecidual ao longo do processo de cicatrização. Desta forma, as amostras foram coletadas em diferentes fases do processo de cicatrização: 2º, 3º dias - fase inflamatória, 7º dia - fase proliferativa, e 10º dia - fase de remodelamento tecidual (3 – 4 animais, em cada fase). (B) Período de fechamento da lesão em cada grupo experimental (3 – 4 animais). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT.

5.5. AVALIAÇÃO DA TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A partir da quantificação do número de células positivas para a proteína PCNA, foi possível avaliar o número de fibroblastos em proliferação durante a fase de remodelamento tecidual do processo de reparo. As avaliações mostraram que houveram reduções significativas na taxa de proliferação celular em amostras teciduais coletadas dos animais que não expressam os receptores B₂ (Figura 11 e 12). As reduções calculadas foram de $39,01 \pm 5,96\%$ (KOB₂) e $38,03 \pm 4,32\%$ (KOB₁B₂), quando comparados ao grupo WT ($50,83 \pm 7,08$ células/campo). Novamente, não foram observadas alterações significativas nos animais KOB₁ (Figura 12).

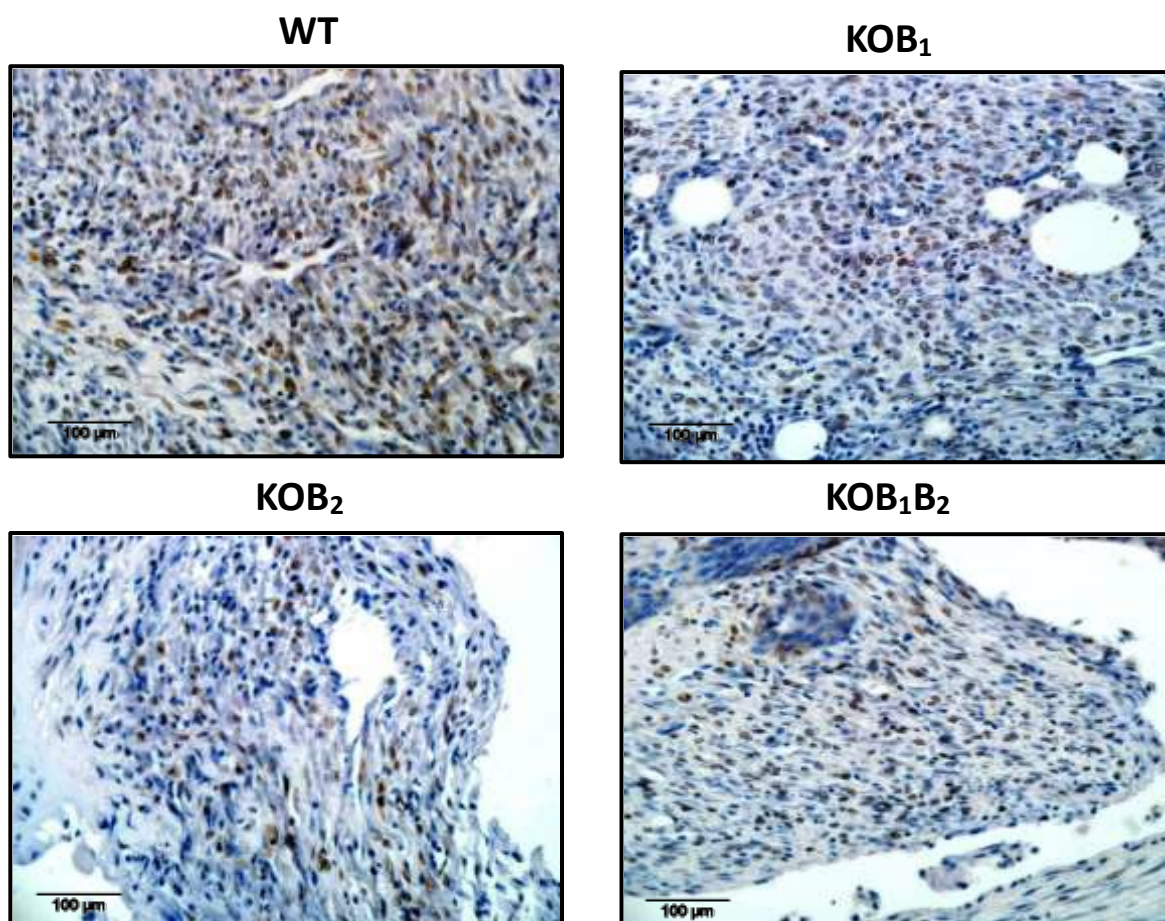


Figura 11. Fotos representativas de amostras de tecido da ferida de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea imunomarcadas para PCNA. As amostras teciduais foram coletadas no 10º dia após a realização do processo cirúrgico com o auxílio de um *punch* (6 mm). Posteriormente, as amostras foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em contes de 5 μm e incubadas com o anticorpo para PCNA, 400x.

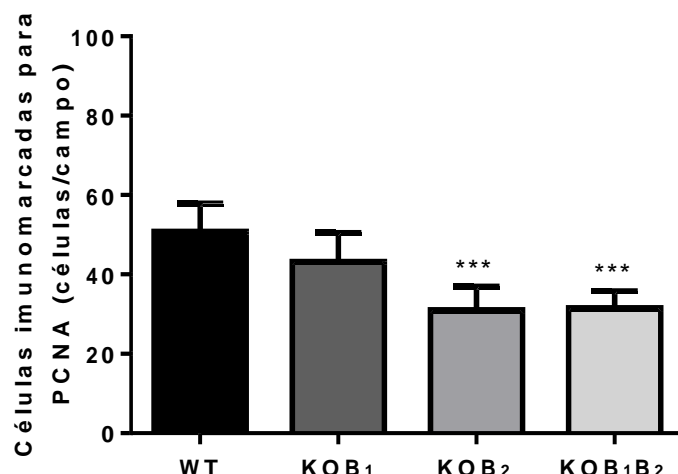


Figure 12. Quantificação do número de células imunomarcadas para a proteína PCNA em amostras teciduais coletadas durante a fase de remodelamento tecidual do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. A quantificação foi realizada a partir de fotos de lâminas histológicas de amostras teciduais coletadas no décimo dia após a realização do processo cirúrgico, com o auxílio de um *punch* (6 mm). A contagem de células imunomarcadas foi realizada com o auxílio do software “ImageJ”, sendo analisados 12 campos de 3 cortes histológicos distintos por lâmina, três lâminas por animal, havendo 3 -4 animais por grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT.

5.6. QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE MIOFIBROBLASTOS

Os miofibroblastos são células com grande importância durante a fase de remodelamento tecidual, estando diretamente relacionados com a resolução do processo de reparo, atuando, principalmente, na contração da lesão. Assim, foi realizada a quantificação do número de miofibroblastos presentes em amostras teciduais coletadas no 10º após a realização da excisão, a partir da quantificação de células imunomarcadas para α -SMA. As análises mostraram reduções no número de células positivas para α -SMA em animais nocaute para o receptor B₂ (Figura 13 e 14). Foram observadas reduções iguais a $34,87 \pm 3,31\%$ (KOB₂) e $44,10 \pm 3,54\%$ (KOB₁B₂) quando comparado ao grupo WT ($32,5 \pm 4,92$ células/campo). Não foram detectadas alterações significativas nos tecidos obtidos de animais KOB₁ (Figura 14).

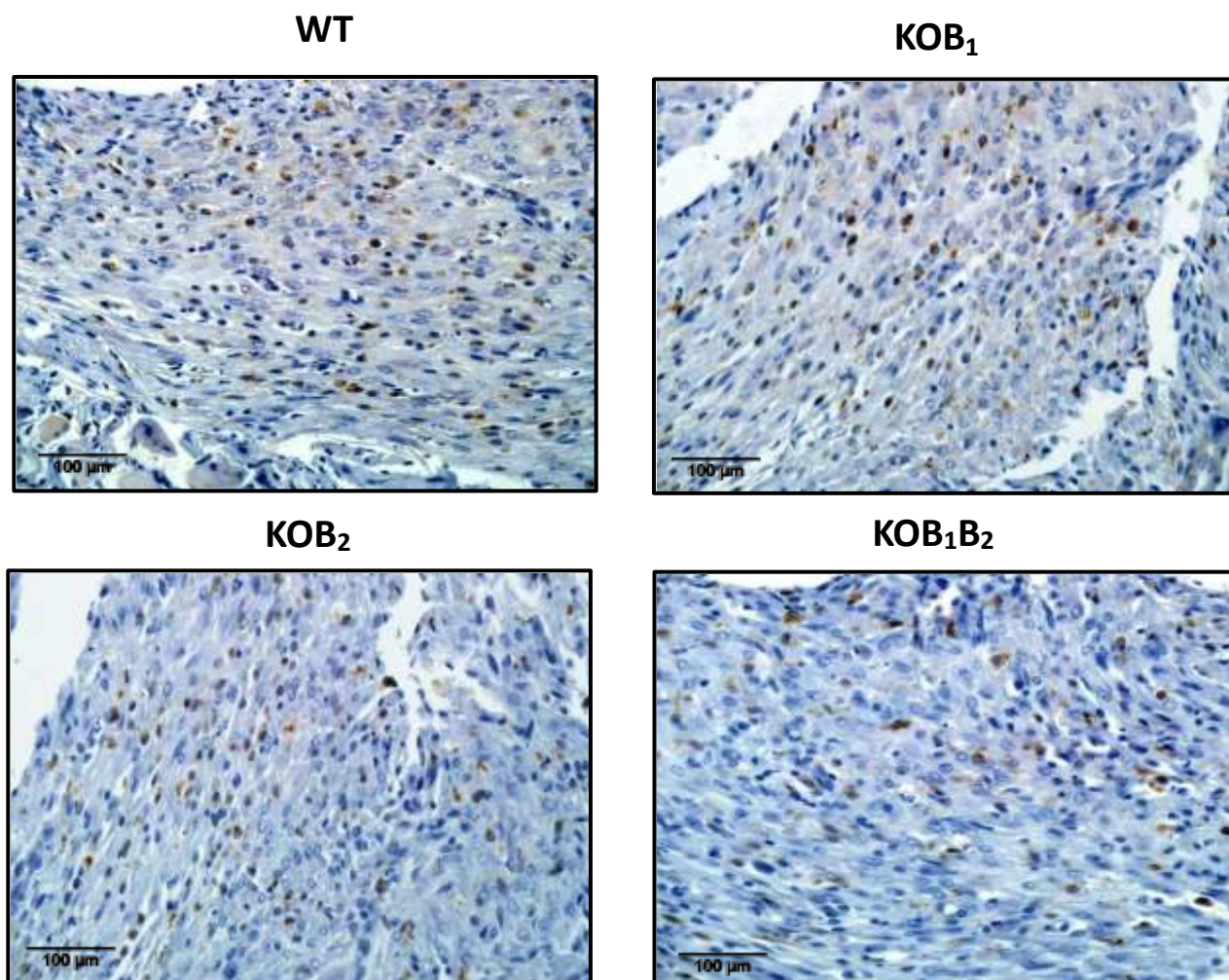


Figura 13. Fotos representativas do tecido da ferida de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea com imunomarcagem para a α -SMA. As amostras teciduais foram coletadas no décimo dia após a realização do processo cirúrgico com o auxílio de um *punch* (6 mm). Posteriormente, as amostras foram fixadas em ALFAC, desidratadas, emblocadas, seccionadas em contes de 5 μm e incubadas com o anticorpo para α -SMA, 400x.

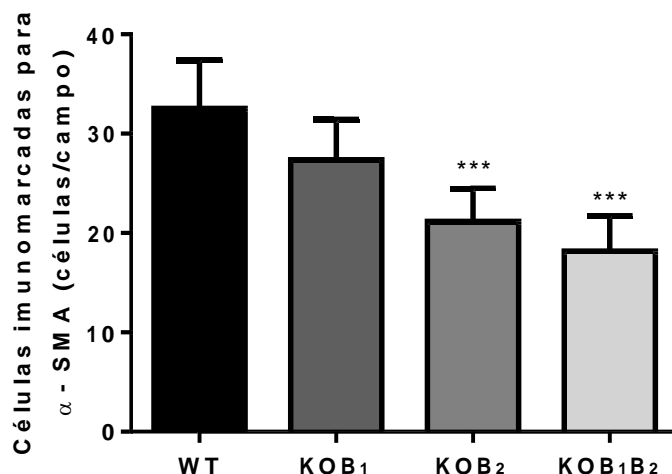


Figure 14. Quantificação do número de células imunomarcadas para α -SMA em amostras teciduais coletadas durante a fase de remodelamento tecidual do processo de cicatrização de animais nocaute para os receptores das cininas (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e animais *wild type* (WT), submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. A quantificação foi realizada a partir de fotos de lâminas histológicas de amostras teciduais coletadas no décimo dia após a realização do processo cirúrgico, com o auxílio de um *punch* (6 mm). A contagem de células imunomarcadas foi realizada com o auxílio do software “ImageJ”, sendo analisados 12 campos de 3 cortes histológicos distintos por lâmina, três lâminas por animal, havendo 3 - 4 animais por grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle WT

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de animais nocautes tem auxiliado na compreensão e determinação “*in vivo*” do envolvimento de diversos fatores de crescimento, moléculas constituintes da matriz extracelular e proteínas estruturais durante os processos que compõem a reparação tecidual (GROSE e WERNER, 2004). Igualmente, o desenvolvimento de animais com deleção dos receptores cininérgicos foram ferramentas importantes para a compreensão do sistema das cininas e seu envolvimento em diferentes processos fisiopatológicos, como, por exemplo, rinite alérgica, cirrose, doenças do coração, traumas cerebrais, doença de Alzheimer, asma, pancreatíte e sepse (GROSE; WERNER, 2004; GURTNER et al., 2008).

Assim, visando elucidar o possível envolvimento do sistema das cininas durante o processo de reparação tecidual, animais nocaute para os receptores cininérgicos (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) foram submetidos ao modelo de cicatrização por excisão, nesse modelo a redução da área da ferida representa um indicativo da taxa de cicatrização cutânea. Os resultados obtidos mostraram que no décimo dia após a realização do processo de excisão, os animais nocaute apresentaram diferenças com relação à contração da ferida, em comparação com o grupo controle WT. Ou seja, a ausência dos dois receptores das cininas promoveu atraso no processo de cicatrização cutânea, sugerindo a participação do sistema das cininas no processo de reparação tecidual.

Uma vez que, diferenças foram visualizadas no modelo de excisão cutânea quando avaliado por dez dias e que mesmo o grupo controle WT não apresentou oclusão completa da lesão neste período, foi realizada uma segunda avaliação da taxa de cicatrização para verificar o tempo necessário para a resolução total da ferida nos animais nocaute e WT. Observamos que as diferenças na taxa de cicatrização se mantiveram e o atraso na contração das feridas nos grupos nocaute foi comprovado. Assim, os animais controle apresentaram resolução completa de suas lesões em média de 12 dias após a realização da excisão, já os animais nocaute tiveram suas lesões elucidadas com 17 (KOB₁), 21 (KOB₂) e 23 dias (KOB₁B₂).

Dando continuidade à investigação do envolvimento do sistema das cininas no processo de cicatrização cutânea, foram realizadas análises durante as diferentes fases do processo de reparo, com o objetivo de avaliar a participação dos receptores para estes peptídeos vasoativos nos diferentes processos que compõem a reparação tecidual. Durante o processo cicatricial leucócitos infiltrados no local da injúria são os principais componentes celulares da resposta inflamatória. Eles não são somente células imunes efetivas contra a invasão de possíveis patógenos, mas também estão envolvidos na fase catabólica de degradação do tecido, principalmente ao produzir proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS) (DUCHENE et al., 2007). O infiltrado celular também tem papel importante na fase anabólica de reconstituição do tecido lesionado ao produzir diversos fatores de crescimento e citocinas que irão dar continuidade ao processo de cicatrização (LAU et al., 2009). Assim o influxo excessivo ou reduzido de leucócitos no tecido lesionado pode interferir na migração, proliferação e diferenciação de outras células, como por exemplo, fibroblastos e queratinócitos, e finalmente na qualidade da resposta de reparo (GILLITZER e GOEBELER, 2001; EMING et al., 2007).

Desta forma, com o objetivo de avaliar o infiltrado celular nos animais submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea, foram realizadas quantificações a partir de imagens histológicas de amostras teciduais coletadas no 2º e 3º dia, após a realização do processo operatório. Os resultados mostraram que os grupos nocaute para os receptores cininérgicos apresentaram menor influxo de células inflamatórias no tecido lesionado, quando comparados com o grupo WT. Este efeito não foi surpresa, uma vez que o envolvimento das cininas no processo de migração celular já é conhecido. Estudos já mostraram que a utilização de um antagonista específico para o receptor B₂, HOE140, inibiu o influxo celular promovido pela administração de BK de maneira dose-dependente (CALIXTO et al., 2000; DUCHENE et al., 2007). Além disso, essa redução no influxo celular foi similarmente observada após a administração de um antagonista dos receptores B₁, des-Arg⁹-Leu⁸-BK (CALIXTO et al., 2003), mostrando que os dois receptores estão envolvidos nesse evento da inflamação. Além disso, as cininas estão relacionadas com aumento da permeabilidade vascular e favorecimento do processo de diapedese de células inflamatórias, assim como

os seus receptores, que participam de processos de quimiotaxia de diversos tipos celulares (CALIXTO et al., 2003; DUCHENE et al., 2007).

Os receptores B₁ parecem estar associados a importantes processos referentes à migração de neutrófilos, como, recrutamento, rolamento, adesão e migração celular, propriamente dita (COUTURE e HARRISSON, 2001). Já os receptores B₂ estão associados ao recrutamento de mononucleares para o local da injúria. Isso por que estudos mostram que o antagonista HOE140 afeta a migração de macrófagos em modelo de pleurisia, sem afetar o extravasamento plasmático e a migração de neutrófilos (COUTURE e HARRISSON, 2001). Além disso, a estimulação de receptores B₂ favorece a migração de monócitos através da ativação da enzima fosfolipase C e conseqüente aumento da concentração de cálcio intracelular, reafirmando o envolvimento desse receptor na migração destes tipos celulares (BERTRAM et al., 2007).

A fase inflamatória do processo de cicatrização caracteriza-se pelo aumento do número de células polimorfonucleares nos dois primeiros dias após a ocorrência da lesão, havendo redução destas células e aumento do influxo de mononucleares a partir do terceiro dia. Desta forma, unindo aos resultados obtidos é possível que a ausência do receptor B₁ possa estar influenciando a migração de neutrófilos, enquanto a ausência do receptor B₂ parece estar regulando negativamente o influxo de monócitos nos animais nocaute. Esse é um dos fatores que pode estar alterando as demais fases do processo de cicatrização, já que o infiltrado celular possui um importante papel na fase anabólica de reconstrução do tecido lesionado, devido à produção de diversos fatores de crescimento e citocinas que contribuem para a manutenção e continuidade do processo de reparação tecidual. Assim, um excessivo ou reduzido influxo de leucócitos no local da injúria tecidual pode interferir na migração, proliferação e diferenciação de outras células, como fibroblastos e queratinócitos, interferindo na qualidade do reparo tecidual (GILLITZER e GOEBELER, 2001; EMING et al., 2009).

Leibovich *et al.* (2005) demonstraram a importância do influxo celular no processo de cicatrização através do estudo com camundongos com depleção de células leucitárias, onde estes animais apresentaram retardo no processo de reparação tecidual. Sendo este atraso associado a reduções no

processo de reepitelização, angiogenese e formação de tecido de granulação aberrante (MARTIN e LEIBOVICH, 2005; MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011). Desta maneira, a expressiva redução da migração celular promovida pela ausência dos receptores B₁ e B₂ na fase inicial do processo de cicatrização, seria um fator suficiente capaz de alterar as demais fases do processo de cicatrização.

O colágeno é uma proteína estrutural de grande importância em tecidos conectivos e desempenha um importante papel em processos de cicatrização, onde participa diretamente da reconstituição da matriz extracelular (SANDHU et al., 2012). A deposição e remodelamento do colágeno contribuem para o aumento da força tênsil do tecido lesionado. Contudo, a síntese excessiva ou reduzida de colágeno pode resultar em danos no processo de reparação, resultando na formação de cicatrizes anormais (VANCHERI et al., 2005).

A quantificação de hidroxiprolina permite a determinação indireta do conteúdo de colágeno tecidual (REDDY e ENWEMEKA, 1996). Assim, a partir de amostras teciduais coletadas durante as diferentes fases do processo de cicatrização, além de amostras coletadas após resolução completa da ferida, foi realizada a avaliação do conteúdo de hidroxiprolina tecidual nos animais nocaute (KOB₁, KOB₂ e KOB₁B₂) e WT submetidos ao modelo de cicatrização por excisão cutânea. Os dados mostraram menores índices de hidroxiprolina tecidual em todas as diferentes fases do processo de cicatrização nos animais com deleção dos receptores das cininas, quando comparados ao grupo WT. Mesmo após a resolução completa da lesão esse perfil se manteve, permanecendo a ocorrência de reduções significativas dos índices de hidroxiprolina tecidual nos grupos nocaute. A partir do perfil de resposta observado, é possível deduzir o envolvimento, direto ou indireto, de ambos os receptores das cininas na produção de colágeno na pele, notando-se também que os animais duplo nocaute apresentaram redução intensa na quantidade de hidroxiprolina do início ao fim da cicatrização. Contudo, o receptor B₂ parece estar envolvido na fase inicial e o receptor B₁ nas fases tardias do processo de síntese de colágeno durante a cicatrização. Isso é devido ao fato que, no início da cicatrização (dias 2 e 3) os animais nocaute para o receptor B₂ mostraram reduções significativas nos níveis de colágeno tecidual, do que as observadas

no grupo nocaute para o receptor B₁. No 7º dia a avaliação mostrou a inversão deste resultado, onde KOB₂ mostra mais colágeno do que os KOB₁. Além disso, CÁATALAN *et al.* (2012) mostraram, a partir de estudos com fibroblastos e miofibroblastos isolados do coração de ratos enfartados, que estes tipos celulares apresentam expressão constitutiva de receptores cininérgicos. Contudo, os fibroblastos apresentam apenas o receptor B₂, enquanto miofibroblastos expressam ambos os receptores, B₁ e B₂ (CATALÁN *et al.*, 2012). Estes resultados poderiam explicar o perfil do nível de hidroxiprolina tecidual observado, uma vez que, fibroblastos são os principais tipos celulares envolvidos na síntese de colágeno nas fases iniciais do processo de reparo, já nas fases intermediárias e tardias seriam os miofibroblastos.

Logo, as alterações nos índices de hidroxiprolina observadas no tecido de animais nocaute pode ser resultante de interferência direta na síntese e deposição de colágeno e/ou por redução no número de fibroblastos e/ou miofibroblastos, sendo esses os principais tipos celulares envolvidos na síntese de componentes da matriz extracelular (SHOULDERS e RAINES, 2009). FRIMM *et al.* (1996) demonstraram que o bloqueio de receptores cininérgicos promoveu redução da deposição de tecido fibroso no miocárdio de ratos enfartados, o que foi verificado através de reduções na deposição de fibras de colágeno (FRIMM *et al.*, 1996). Este é mais um estudo sugerindo que as cininas estão envolvidas em processos referentes à síntese e deposição de colágeno, um parâmetro essencial durante o processo de cicatrização, uma vez que, esta diretamente envolvida com a qualidade do reparo tecidual.

Lesões cutâneas causadas por *punch*, como a utilizada no modelo de excisão, são um modelo útil para avaliar a taxa de reepitelização durante um processo de cicatrização (KIM *et al.*, 2008). Assim, a partir de imagens dos cortes histológicos de amostras coletadas nas diferentes fases do processo de cicatrização, foi possível mensurar a taxa de reepitelização nos diferentes grupos nocaute e WT. Este é um parâmetro que indica a taxa de migração e proliferação dos queratinócitos e os resultados evidenciaram que novamente há o envolvimento do sistema das cininas nesses processos. Diferentemente, neste parâmetro os receptores B₂ parecem ter maior envolvimento, uma vez que, a ausência deste promoveu reduções significativas na taxa de reepitelização, em comparação com o grupo controle. O envolvimento dos

receptores das cininas na modulação da proliferação de queratinócitos da pele foi apresentado por PIETROVSKI *et al.* (2011), onde a administração de SSR 240612 (antagonista do receptor B₁) ou FR173657 (antagonista do receptor B₂) promoveram reduções na taxa de hiperproliferação de queratinócitos na orelha de camundongos. Além disso, TALWAR *et al.* (1990) observaram que o tratamento de queratinócitos humanos com BK levou ao rápido e significativo aumento nos níveis dos segundo mensageiros IP₃ e DAG, sendo a ativação dessas vias diretamente relacionada com o aumento da taxa de crescimento dessas células. Esta indução parece ser mediada pela ativação de receptores B₂, uma vez que, quando estimuladas com des-Arg⁹-BK o mesmo perfil de indução da proliferação dos queratinócitos não foi observado (TALWAR *et al.*, 1990).

O envolvimento dos receptores B₂ foi novamente detectado na avaliação da taxa de fibroblastos em proliferação durante a fase de remodelamento tecidual, através da quantificação de células imunomarcadas para a proteína PCNA. O PCNA é um co-fator essencial para a replicação gênica, o qual se posiciona ao redor da fita de DNA orientando a atividade da DNA polimerase. Assim, expressão dessa proteína está associada à proliferação celular, tendo máxima expressão nas fases G1 e S do ciclo celular (MOLDOVAN; PFANDER; JENTSCH, 2007). Desta forma, as reduções significativas no número de fibroblastos imunomarcados positivamente para a proteína PCNA nas feridas de animais nocaute para o receptor B₂, reforçam o envolvimento das cininas no processo de proliferação celular. Alguns estudos sustentam o possível envolvimento das cininas em processos de migração e proliferação celular, como WIERNAS *et al.* (1998). Eles demonstraram a indução da proliferação de células epiteliais da córnea humana por BK, sugerindo que este peptídeo possui importante papel na cicatrização desse tecido (WIERNAS e DAVIS, 1998). VANCHERI *et al.* (2005) verificaram que em cultura de fibroblastos de pulmão a BK é capaz de induzir a proliferação e a diferenciação de fibroblastos, assim como, aumentar a síntese de colágeno. Da mesma forma, SABATINI *et al.* (2013) mostraram a partir da cultura de fibroblastos bronquiais que o receptor B₂ das cininas está envolvida nos processos de proliferação e diferenciação destes tipos celulares, uma vez que, a utilização de um antagonista específico, HOE140, suprimiu as respostas

mitogênicas induzidas por BK (SABATINI et al., 2013). Estes artigos corroboram com os resultados obtidos, confirmando a participação das cininas nestes processos celulares essenciais ao reparo tecidual.

Outro componente essencial para a resolução de lesões cutâneas é o aparecimento dos miofibroblastos. Estes são fibroblastos com características de células musculares lisas, possuindo um importante papel na contração da ferida durante o processo de reparação tecidual. Os miofibroblastos expressam actina de musculatura lisa do tipo alfa (α -SMA), assim como células do músculo liso vascular, o que lhes conferem maior força contráctil, comparado com fibroblastos α -SMA negativos (ALMEIDA, 2014).

Uma vez que foi observado retardo na contração da lesão, nos grupos nocaute, tornou-se interessante a avaliação do número de miofibroblastos presentes em amostras coletadas no décimo dia após a realização da excisão cutânea. A partir da contagem de células imunomarcadas positivamente para α -SMA observou-se menor índice de miofibroblastos nos grupos nocaute KOB₂ e KOB₁B₂. Indicando o possível envolvimento do receptor B₂ na diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. Em seu trabalho KIM et al. (2008) demonstraram que a BK estimula a expressão α -SMA em células tronco mesenquimais, ao ativar o receptor B₂ e estimular a liberação de TGF- β . Além disso, os autores sugerem que a ativação do receptor B₂ é crucial para os processos de remodelagem tecidual e fibrose, uma vez que o α -SMA é um marcador de células contráteis como os miofibroblastos, que estão altamente envolvidos no processo de reparação tecidual (KIM et al., 2008). Da mesma maneira, SABATINI et al. (2013) demonstraram que a ativação dos receptores cininérgicos B₂ induz a expressão e polimerização de α -SMA em miofibroblastos bronquiais, o que foi completamente suprimido pelo antagonista HOE140 (SABATINI et al., 2013). Nossos dados corroboram com os já descritos na literatura, correlacionando a ativação do receptor B₂ das cininas à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, uma vez que, a deleção desses receptores promoveu reduções significativas do número de miofibroblastos presentes na fase de remodelamento tecidual de animais nocautes submetidos ao modelo de excisão cutânea.

Os resultados obtidos comprovam o envolvimento das cininas no processo de reparação cutânea, uma vez que, a ausência dos receptores B₁ e

B₂ prejudicou a resolução do processo de cicatrização em camundongos nocaute. Além disso, o receptor B₂ está envolvido na regulação da proliferação de células da pele, como queratinócitos e fibroblastos, bem como no processo de diferenciação celular, estando diretamente relacionado ao aparecimento de miofibroblastos durante o processo de cicatrização (figura 15).

São muitos os fatores que podem interferir, em uma ou mais fases do processo de cicatrização, prejudicando a resposta de reparo e podendo levar ao desenvolvimento de cicatrizes hipertróficas, quelóides, ou então à cronificação do processo (GUO e DIPIETRO, 2010). A diabetes, por exemplo, prejudica a cicatrização em diversos estágios do processo, levando a redução da taxa de proliferação de fibroblastos, atrasos na reepitelização e ocorrência de hipóxia devido a prejuízos na formação de novos vasos sanguíneos (SUN, 2014).

A utilização de alguns medicamentos também pode alterar a resposta de reparo, como os glicocorticóides, que suprimem respostas da fase inflamatória do processo de cicatrização, reduzem a taxa de proliferação de diversos tipos celulares e a contração da lesão (MENDONÇA, 2009). Da mesma forma, a utilização de anti-inflamatórios não esteroídes (AINE) utilizados no tratamento de diversas doenças como, artrite reumatóide, promovem efeitos negativos à resolução do processo de reparo, reduzindo a agregação plaquetária, infiltrado e proliferação celular. Quimioterápicos interferem em vias referentes ao metabolismo celular, divisão celular ou angiogenese com o intuito de combater células cancerosas. Esses medicamentos inibem a síntese de DNA, RNA ou proteínas, promovendo reduções na taxa de reepitelização, fibroplasia e neo-vascularização nos tecidos lesionados (GUO e DIPIETRO, 2010).

Além disso, os altos custos dos tratamentos de patologias relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância de estudos em busca de alternativas terapêuticas capazes de modular processos que compõem o reparo tecidual objetivando acelerar a resolução da lesão (SUN, 2014). Os resultados obtidos neste estudo auxiliam na compreensão dos eventos envolvidos na cicatrização cutânea e revelam o envolvimento e contribuição do sistema das cininas em todas as fases que compõem o processo de reparo tecidual. Desta forma esses peptídeos poderiam ser

empregados na modulação de diferentes etapas do processo cicatricial, auxiliando na sua resolução, tornando-os uma potencial alternativa terapêutica.

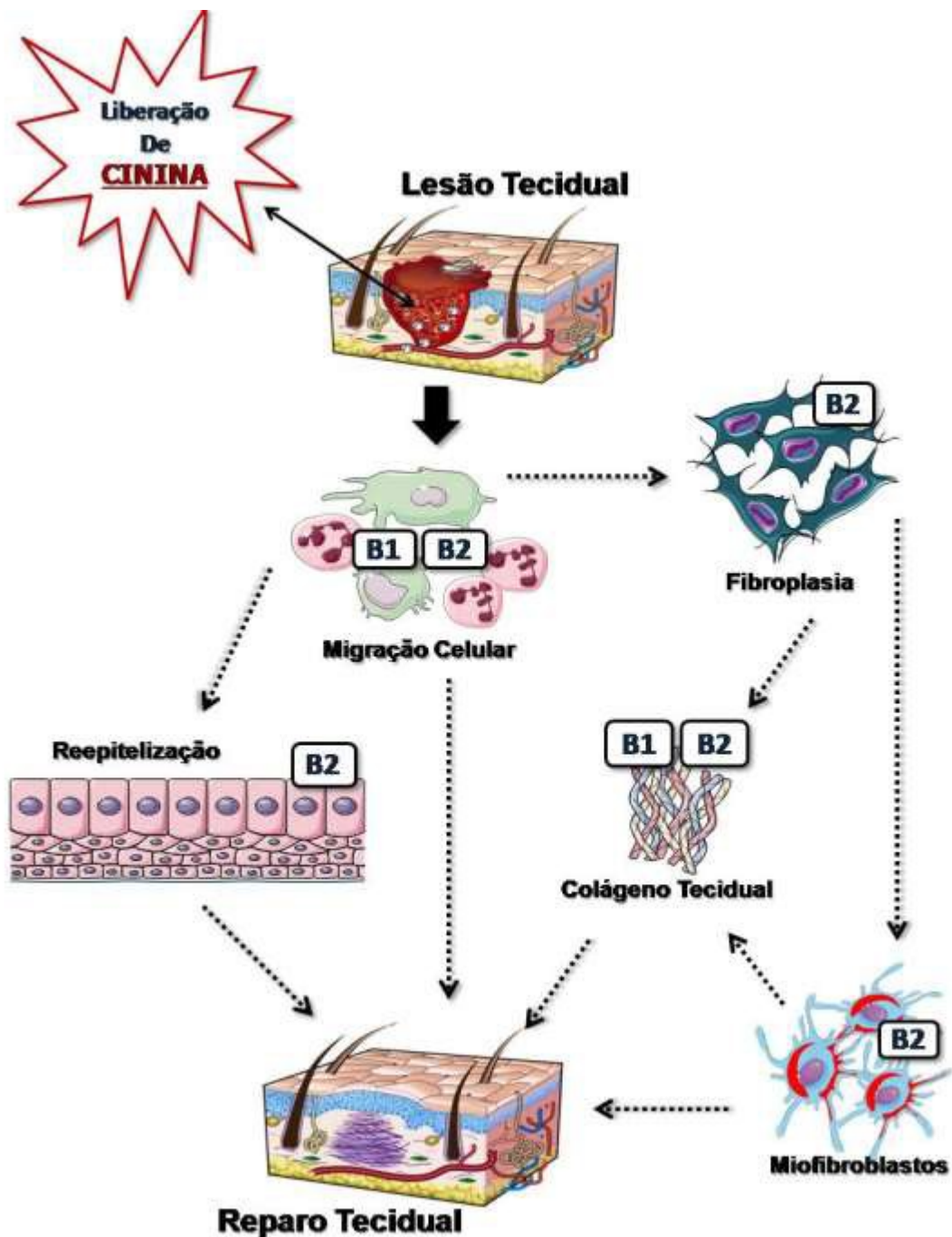


Figura 15. Esquema demonstrando o envolvimento dos receptores das cininas em diferentes processos na cicatrização cutânea. Com base nos resultados obtidos nesse estudo ambos os receptores das cininas (B_1 e B_2) participam de eventos que compõem a reparação tecidual, como influxo de células inflamatórias para o tecido lesionado e síntese de colágeno. Os receptores B_2 estão também relacionados com a reepitelização, fibroplasia e na diferenciação de miofibroblastos. Portanto, a ausência dos receptores cininérgicos, conseqüentemente do sistema das cininas, promove desestruturação da formação do tecido de granulação e retardo na contração da ferida, gerando deficiência na cicatrização.

7. CONCLUSÃO

- Os resultados comprovam o envolvimento das cininas no processo de reparação cutânea, uma vez que, a ausência dos receptores B₁ e/ou B₂, responsáveis por desencadear as atividades destes peptídeos, prejudicou a resolução do processo de cicatrização em camundongos nocaute;
- Análises histológicas de amostras teciduais dos animais nocaute demonstraram reduções significativas do influxo de células inflamatórias no tecido lesionado, sugerindo a participação de ambos os receptores cininérgicos nesse processo;
- Resultados obtidos através da avaliação da taxa de reepitelização mostraram que a proliferação e migração de queratinócitos foram menores nos animais nocautes KOB₂ e KOB₁B₂, sugerindo a participação do receptor B₂ nesses processos;
- A partir das dosagens teciduais, observaram-se reduções dos níveis de hidroxiprolina, nas fases iniciais e tardias do processo de cicatrização, nos grupos nocautes para os receptores das cininas, sugerindo a participação do sistema das cininas em processos de síntese e/ou deposição de colágeno.
- Avaliações imunohistoquímicas mostraram menor taxa de fibroblastos em proliferação durante a fase de remodelamento tecidual nos grupos KOB₂ e KOB₁B₂, reforçando a atividade mitogênica do receptor B₂;
- Quantificações mostraram menores índices de miofibroblastos em amostras coletadas durante a fase de remodelamento tecidual nos grupos KOB₂ e KOB₁B₂, sugerindo a participação do receptor B₂ nesse processo de diferenciação celular;

REFERÊNCIAS

- ALMEIDAI, B. DE; NASCIMENTO, M. DO; PEREIRA-FILHO, R.; et al. Immunohistochemical profile of stromal constituents and lymphoid cells over the course of wound healing in murine model. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 596–602, 2014.
- BALBINO, C.; PEREIRA, L.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, 2005.
- BERTRAM, C. M.; BALTIC, S.; MISSO, N. L.; et al. Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 6, p. 1445–54, 2007.
- BLAIS, C.; ROULEAU, J.; ADAM, A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. **Peptides**, v. 21, p. 1903–1940, 2000.
- BOCK, M.; LONGMORE, J. Bradykinin antagonists: new opportunities. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, p. 401–406, 2000.
- BORKOWSKI, J.; RANSOM, RW, SEABROOK GR, TRUMBAUERI HC, HILL RG, STRADER CD, H. J. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. **Journal of Biological chemistry**, v. 270, n. 23, p. 13706–13710, 1995.
- BURRELL, H. E.; SIMPSON, A. W. M.; MEHAT, S.; et al. Potentiation of ATP- and bradykinin-induced [Ca²⁺]_i responses by PTHrP peptides in the HaCaT cell line. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 5, p. 1107–15, 2008.
- CALIXTO, B.; SANTOS, D. R.; SOUZA, G. E. . Effect of a kinin B 2 receptor antagonist on LPS- and cytokine- induced neutrophil migration in rats. **British journal of pharmacology**, v. 139, p. 271–278, 2003.

CALIXTO, J.; CABRINI, D.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 1–5, 2000.

CAMPBELL, D. The renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, p. 784–791, 2003.

CATALÁN, M.; SMOLIC, C.; CONTRERAS, A.; et al. Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 261, n. 3, p. 300–8, 2012.

CAYLA, C.; MERINO, V.; CABRINI, D. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. **International immunopharmacology**, v. 2, p. 1721–1727, 2002.

COSTA-NETO, C. M.; DILLENBURG-PILLA, P.; HEINRICH, T. A; et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 135–42, 2008.

COUTURE, R.; HARRISSON, M. Kinin receptors in pain and inflammation. **European journal of pharmacology**, v. 429, p. 161–176, 2001..

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin. **Clin Dermatol**, 19(5):573-85, 2001.

DENNING, M.F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol**, 36(7):1141-6, 2004

DUCHENE, J.; LECOMTE, F.; AHMED, S.; et al. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 4849–4856, 2007.

EMING, S. A; BRACHVOGEL, B.; ODORISIO, T.; KOCH, M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. **Progress in histochemistry and cytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 115–70, 2007.

EMING, S. A; HAMMERSCHMIDT, M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 5, p. 517–27, 2009.

ENOCH, S.; LEAPER, D. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, 2008.

FRIMM, C. D. C.; SUN, Y.; WEBER, K. Wound healing following myocardial infarction in the rat: role for bradykinin and prostaglandins. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 1285, p. 1279–1285, 1996.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp 253 – 259, 1999.

GNIADCKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **Gen Pharmacol**, 30(5):619-22, 1998.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. April, p. 513–21, 2001.

GREAVES, N. S.; ASHCROFT, K. J.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of dermatological science**, v. 72, n. 3, p. 206–17, 2013.

GRECO, S.; ELIA, M. G.; MUSCELLA, A; et al. Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. **The Journal of endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 291–301, 2005.

GROSE, R.; WERNER, S. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. **Molecular biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 147–166, 2004.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219–29, 2010.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–21, 2008.

HALL, J. Bradykinin receptors. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 28, n. 1, p. 1–6, 1997.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev Bras Farmacol**, v. 88, n. 2004, p. 53–58, 2007..

HU, M. S.-M.; RENNERT, R. C.; MCARDLE, A.; et al. The Role of Stem Cells During Scarless Skin Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 3, n. 4, p. 304–314, 2014.

KAKOKI, M.; SMITHIES, O. The kallikrein – kinin system in health and in diseases of the kidney. , v. 75, n. 10, p. 1019–1030, 2009.

KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D. G. The ARRIVE guidelines Animal Research: Reporting In Vivo Experiments. **Plos Biology**, 2010.

KIM, Y. M.; JEON, E. S.; KIM, M. R.; LEE, J. S.; KIM, J. H. Bradykinin-induced expression of alpha-smooth muscle actin in human mesenchymal stem cells. **Cellular signalling**, v. 20, n. 10, p. 1882–9, 2008.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic science international**, v. 203, n. 1-3, p. 93–8, 2010.

LAI, J.; LAI, K.; CHUANG, K.; CHANG, P. Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF- α expression. **The Journal of clinical investigation**, p. 3739–3751, 2009.

LAU, K.; PAUS, R.; TIEDE, S.; DAY, P.; BAYAT, A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. **Experimental dermatology**, v. 18, n. 11, p. 921–33, 2009.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.

MAHDAVIAN DELAVARY, B.; VEER, W. M. VAN DER; EGMOND, M. VAN; NIESSEN, F. B.; BEELEN, R. H. J. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753–62, 2011.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism - State of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Exp. Gerontol**, 42(9):879-886, 2007.

MANDELBAUM, S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525–542, 2003.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 845–52, 2004.

MARGOLIUS, H. Tissue kallikreins structure, regulation, and participation in mammalian physiology and disease. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 16, p. 337–349, 1998.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 11, p. 599–607, 2005.

MENDONÇA, R. J. DE. Aspectos celulares da cicatrização *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.

MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. , v. 41, n. 3, p. 259–264, 2008.

MOUSSAD, E. E.; BRIGSTOCK, D. R. Connective tissue growth factor: what's in a name? **Molecular genetics and metabolism**, v. 71, n. 1-2, p. 276–92, 2000.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.JR.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(14):8140-5, 2000.

PHYSIOL, A. J.; INTEGR, R.; PHYSIOL, C.; R, R.; SCHMAIER, A. H. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. **Am J Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, p. 1–13, 2003.

PIETROVSKI, E. F.; PALUDO, K. S.; MENDES, D. A. G. B.; et al. B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. **Journal of dermatological science**, v. 64, n. 1, p. 23–30, 2011.

PLOEGER, D. T.; HOSPER, N. A; SCHIPPER, M.; et al. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. **Cell communication and signaling : CCS**, v. 11, n. 1, p. 29, 2013.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1996.

REGOLI, D.; ALLOGHO, S.; RIZZI, A.; GOBEIL, F. Bradykinin receptors and their antagonists. **European journal of pharmacology**, v. 348, p. 1–10, 1998.

REGOLIT, D.; BARABEF, J. Pharmacology Of Bradykinin and Related Kinins. **The american Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 32, p. 1–46, 1980.

RODRIGUES, E. S.; SILVA, R. F.; MARTIN, R. P.; et al. Evidence that kinin B2 receptor expression is upregulated by endothelial overexpression of B1 receptors. **Peptides**, v. 42, p. 1–7, 2013.

SABATINI, F.; LUPPI, F.; PETECCHIA, L.; et al. Bradykinin-induced asthmatic fibroblast/myofibroblast activities via bradykinin B2 receptor and different MAPK pathways. **European journal of pharmacology**, v. 710, n. 1-3, p. 100–9, 2013.

SALEH, T.; CALIXTO, J.; MEDEIROS, Y. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European journal of pharmacology**, p. 43–52, 1997.

SANDHU, S. V; GUPTA, S.; BANSAL, H.; SINGLA, K. Collagen in Health and Disease. **Journal of Orofacial Research**, v. 2, n. September, p. 153–159, 2012.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R.; PRANTL, L. Wound healing in the 21st century. **Journal of the American academy of dermatology**, v. 63, n. 5, p. 866–881, 2010.

SCHREMMER-DANNINGER, E.; HERMANN, A.; EDWIN, F.; FRITZ, H.; ROSCHER, A. Identification and occurrence of mRNAs for components of the kallikrein–kinin system in human skin and in skin diseases. **immunopharmacology**, v. 43, p. 287–291, 1999.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 929–58, 2009.

SIMPSON, D.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. **Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. August 1972, p. 2009–2023, 1972.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Science**, 67(5):477-502, 2000.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J Cell Sci**, 117(Pt 5):667-75, 2004.

STEWART, J. M. Bradykinin antagonists: discovery and development. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 527–32, 2004.

SUN, B. . ET AL. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 46, p. 914, 2014.

TALWAR, H.; FISHER, G.; VOORHEES, J. Bradykinin induces phosphoinositide turnover, 1, 2-diglyceride formation, and growth in cultured adult human keratinocytes. **Journal of investigative dermatology**, v. 95, n. 6, p. 705–10, 1990.

THOMAS, D.; O'NEILL, I. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of oral and maxillofacial Surgery**, v. 53, p. 442–447, 1995.

VANCHERI, C.; GILI, E.; FAILLA, M.; et al. Bradykinin differentiates human lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the B2 receptor. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 116, n. 6, p. 1242–8, 2005.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. **Journal of investigative dermatology**, 127:998–1008, 2007.

WIERNAS, T.; DAVIS, T. Effects of bradykinin on signal transduction, cell proliferation, and cytokine, prostaglandin E2 and collagenase - 1 release from human corneal epithelial cells. **British journal of pharmacology**, v. 123, p. 1127–1137, 1998.